

UNIVERSITE SORBONNE PARIS NORD
UFR de SANTE, MEDECINE et BIOLOGIE
HUMAINE

ECOLE DOCTORALE GALILEE
N° attribué par la bibliothèque

THESE
Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
SORBONNE PARIS NORD**

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Caractérisation du trio Syk, Vav1 et β -caténine dans les tumeurs épithéliales

Présentée et soutenue publiquement par

Rofia BOUDRIA

Le 16 mars 2021

Directrice de thèse : Dr Nadine VARIN-BLANK

Co-Directeur de thèse : Dr Lionel Guittat

MEMBRES DU JURY :

Pr Didier Lutomski	Université Sorbonne Paris Nord	Président
Pr Andres Alcover	Institut Pasteur -Paris	Rapporteur
Dr Jacques Nunès	Aix Marseille Université 105	Rapporteur
Dr Severine Letuvé	UFR de Médecine Paris Nord Site Bichat	Examinatrice
Dr Nadine Varin-Blank	Université Sorbonne Paris Nord	Directrice de thèse
Dr Lionel Guittat	Université Sorbonne Paris Nord	Co-Directeur de thèse

Table des matières

Introduction	14
I. Le Facteur d'échange nucléotidique Vav1	17
1. Généralités.....	17
2. Structure de Vav1	17
3. Dualité fonctionnelle de Vav1 dans la signalisation cellulaire	19
3.1. La fonction GEF et sa régulation par phosphorylation	19
3.2. La fonction adaptatrice de Vav1 dans le contrôle de la signalisation et des fonctions cellulaires.....	21
4. Implication de Vav1 dans les cancers	23
4.1. Vav1 dans les hémopathies malignes.....	23
4.2. Vav1 et tumeurs solides.	24
II. La tyrosine kinase Syk	26
1. Généralités.....	26
2. Structure primaire de Syk.....	27
3. Isoformes de Syk.....	27
4. La double fonction de Syk dans les voies de signalisation	29
4.1. La dualité de la fonction kinase	29
4.2. Un adaptateur	29
5. Rôle de Syk dans la signalisation cellulaire	30
5.1. Syk et la voie du BCR	30
5.2. La voie des intégrines et le contrôle de l'adhérence cellulaire.....	32
5.3. Les autres voies de signalisation impliquant Syk.....	33
6. Régulation de l'activation et de l'activité de Syk par phosphorylation	34
6.1. Activation	34
6.2. Mécanisme d'inactivation de Syk	38
7. Dualité fonctionnelle de Syk dans les cancers	39
7.1. Promoteur de tumeur	40
7.2. Suppresseur de tumeur	42
8. Le rôle de Syk au niveau des jonctions intercellulaires et de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)	45
III. β-caténine : une protéine multifonctionnelle.....	46
1. Généralités.....	46
2. Structure	46
3. La β -caténine et l'adhérence cellulaire.....	47
4. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine	48
5. Les gènes cibles de la β -caténine	50

6. Activité transcriptionnelle Wnt indépendante	52
7. Modifications post-traductionnelles : impact sur la localisation et les fonctions	53
7.1. Influence sur l'adhérence cellulaire	56
7.2. Modification du pool cytoplasmique.....	56
7.3. Modification du pool nucléaire et du transport nucléocytoplasmique	57
7.4. La régulation du pool centrosomique de β -caténine	59
8. Implication de la β -caténine dans les cancers	60
8.1. β -caténine et cancer d'origine épithéliale.....	60
8.2. Transition épithélio-mésenchymateuse et β -caténine	61
8.3. β -caténine dans les cancers d'origine hématopoïétique	62
Objectifs de thèse.....	66
Résultats	67
Article: Regulatory interplay between Vav1, Syk and β-catenin occurs in lung cancer cells.....	67
Considérations méthodologiques et résultats complémentaires	99
1. Interaction entre Vav1, Syk et β-caténine dans les cellules B leucémiques.	109
2. Optimisation de l'extinction de la kinase Syk ou de la β-caténine par des lentivirus dans les lignées leucémiques Mec1 et HG3.	110
3. Syk module la phosphorylation de la β-caténine sur la Y142 en aval du BCR.	112
4. Matériels et méthodes utilisés dans l'étude complémentaire	114
Discussion et perspectives	116
1. Le trio Vav1, Syk et β-caténine : similitudes et différences entre cellules épithéliales et hématopoïétiques.....	116
2. La régulation transcriptionnelle de Syk (et stabilisation ?) par la β-caténine.....	119
3. Vav1, Syk et β-caténine : un complexe cytoplasmique et/ou nucléaire ?	120
4. Le complexe Syk-Vav1- β-caténine : importance pour la tumorigénèse ?.....	121
Bibliographie.....	123

Remerciements

Au terme de cette expérience très enrichissante, je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce projet de thèse que j'ai toujours voulu réaliser après mes études de master.

Au membre de jury

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux membres de mon jury. Je remercie Monsieur le Professeur Andres Alcover et Monsieur le Docteur Jacques Nunès d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mon manuscrit. Je remercie également Madame le Docteur Severine Letuvé, examinatrice et Monsieur le Docteur Didier Lutomski, président, qui je l'espère, prendront plaisir à lire ce travail.

A ma directrice de thèse le Docteur Nadine Varin-Blank

Merci de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire dès mon stage de Master 2, superviser mes travaux, pour prendre le temps de faire régner une ambiance de travail solidaire et sympathique. Je te remercie pour ton accompagnement et tes conseils sur le côté scientifique mais également personnel.

A mon co-directeur de thèse le Docteur Lionel Guittat

Un grand merci pour tout ce que tu m'as apporté depuis mon arrivée au laboratoire en stage de Master2. Tu m'as donné le réel sentiment d'appartenir à une équipe. Merci pour ta patience et ton écoute, ton soutien dans les moments difficiles, tu as toujours pris le temps de m'expliquer, de discuter pour avancer ensemble. J'ai beaucoup apprécié nos échanges qui m'ont énormément apporté sur le plan scientifique, culturel mais aussi personnel. Merci également pour la confiance que tu m'as accordée.

A Monsieur le Docteur Dominique Ledoux

Merci de m'avoir accompagnée depuis mon arrivée en France. Tu étais toujours présent pour m'encourager, me conseiller et m'aider à progresser.

A ma tutrice le Docteur Angélique Levoye

Je me souviens toujours de ton cours sur les récepteurs couplés aux protéines G et nos échanges en fin de cours qui ont créé cette relation depuis mon Master1. Merci pour tes conseils tout au long de mon parcours.

Un grand merci à toute l'équipe « UMR INSERM 978 »

A Laura, pour tous tes conseils scientifiques et techniques. Je te remercie infiniment pour tes séances de méditation et tes conseils très constructifs.

Christine, pour ta bonne humeur et surtout les échanges scientifiques qu'on a pu avoir.

A Betty, merci pour tes formations en microscopie et en Cytométrie en flux. Merci de m'avoir aidé dans la construction de mon projet professionnel.

Denis, merci pour tes conseils et ton soutien.

Sanae, pour nos échanges sur le plan scientifique. Tu es une jeune chercheuse pleine d'énergie. Reste comme tu es !

Mélanie et Emilie, merci pour les échanges précieux qu'on a eus.

Stéphanie, merci pour ta joie de vivre communicative. Je suis ravie d'avoir fait ta connaissance et je te souhaite le meilleur.

A mes anciens collègues de bureau Laure et Antonin, je vous remercie pour la bonne ambiance et tous vos conseils professionnels et personnels.

A mon nouveau collègue de bureau Koceila, partager le bureau avec toi pendant la période difficile de la crise sanitaire était un vrai bonheur. Merci pour nos échanges, pour tes conseils et ton aide.

Ma petite Imane, je te remercie pour ton soutien, ta disponibilité et ton écoute, je suis heureuse de partager ce bout de carrière avec toi.

Aux nouveaux doctorants Feriel, Soulayamane et les M2 Assia, Jordan Good luck pour la suite de l'aventure les amis !

Je vous remercie tous pour votre soutien durant ces 4 années ainsi que pour tous les moments de joies, de rires que nous avons eus ensemble.

Aux membres de l'équipe à l'hôpital Avicenne : Grégory Lazarian, Florence Cymbalista, Fanny Baran Marszak, Antoine Martin, Emmanuelle Fabre, Olivier Schischmanoff, un grand merci d'avoir partagé vos expériences, vos conseils et vos idées pertinentes sur nos projets.

A tous mes anciens collègues dans cette aventure :

Vanessa, merci d'avoir initié ce travail.

Rim, la meilleure amie que j'ai rencontrée dans cette aventure. Merci pour ton soutien, ton aide et tes conseils.

Sophie, ton cadeau « super cousine » n'a pas quitté ma blouse depuis ton départ. Tu es une super personne.

Lamia, Maissa, Souhail, Simon, Chloé, Myriam..... C'était un plaisir de vous avoir rencontré.

A mes amies doctorants : Lyasmine, Lyna, Dyhia, Nesrine, Myriam, Mégane, Hivda, merci pour les bons moments que nous avons partagé ensemble.

A ma famille

Un grand merci à mon cher oncle Mohiddine et ma tante Nassima, vous étiez mes deuxièmes parents et sans votre soutien je n'aurais pas pu venir en France.

Mes cousins Samir, Taher, Adlane et mes chères cousines Messaouda, Nabila, Aicha, Yamina, Fatima, Nadjat et Farida, sans oublier les petits cousins (Sara, Imrane,...désolée je ne peux pas citer toutes l'équipe :) . J'ai la chance de vous avoir dans ma vie. Sans vos encouragements je ne serais pas arrivée à ce niveau. Merci !

Je prête une délicate attention Mes chers parents, sans qui je ne serai pas ce que je suis. Je m'excuse de ne pas toujours avoir été très présentes ces dernières années mais je vous remercie chaleureusement pour votre compréhension, votre soutien et le réconfort que vous m'avez toujours apporté. Les mots ne suffiront pas pour vous remercier et j'espère que ce beau cadeau pourra vous rendre fière de moi et croire en moi comme vous l'avez toujours fait.

Ma sœur Ibtissam et mon frère Youssef, je suis chanceuse de vous avoir dans ma vie, vous étiez toujours disponible, compréhensifs et à l'écoute,

Ma belle-mère Samia, mes belles sœurs Zineb, Rayane et Marwa, mon beau-frère Mondir, merci d'avoir fait partie de ma vie et d'avoir toujours eu vos encouragements.

Et pour finir, un immense merci à mon Mari Khebab, celui qui est toujours là pour moi, qui m'a soutenue et me soutient encore les jours de faiblesses, m'encourage et me pousse à aller toujours de l'avant. Merci de me redonner confiance en moi lorsque je la perds, de m'aimer même quand je râle et d'avoir supporté mes périodes d'angoisse. Tu me rends chaque jour plus forte !

Merci mon chéri !

Liste des figures

Figure 1 : les différentes caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses.....	14
Figure 2 : Les quatre grands circuits de signalisation altérés dans les cellules cancéreuses....	15
Figure 3: Structure de Vav1.	18
Figure 4: les différents états conformationnels de Vav1 liés à sa phosphorylations.....	20
Figure 5: Quelques protéines partenaires de Vav1.....	21
Figure 6: Expression tissulaire de Syk..	26
Figure 7: Structure primaire des protéines Syk et Zap70.....	27
Figure 8: Les isoformes de Syk.....	28
Figure 9: Activation de Syk en aval de la signalisation du BCR.	30
Figure 10: Activation de Syk en aval des intégrines.	32
Figure 11: Les principaux sites de phosphorylation de Syk et les protéines capables de lier les résidus phosphorylés.	34
Figure 12: Activation de Syk via les motifs ITAMs.	36
Figure 13: Le modèle d'activation de Syk par phosphorylation des ITAMs, de l'interdomaine et de son auto-phosphorylation..	37
Figure 14: Le rétrocontrôle de Syk par la PKC.....	38
Figure 15: Structure de la β -caténine..	46
Figure 16: Partenaires de la β -caténine au niveau des jonctions d'adhérences.....	47
Figure 17: Interaction de la β -caténine avec les protéines du complexe de destruction.	49
Figure 18: Interaction de la β -caténine avec les facteurs de transcription (TCF/LEF et Foxo) et les co-activateurs Bcl9 et HATs.....	49
Figure 19: La voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	50
Figure 20 : Facteurs impliqués dans la localisation nucléaire de la β -caténine.	57
Figure 21 : La dérégulation de la signalisation WNT dans le microenvironnement favorise la transformation maligne et la progression de la maladie par différents mécanismes.....	60
Figure 22: Co-IP entre Syk, β -caténine et Vav1 dans la lignée Mec1	109
Figure 23: Mise au point de la déplétion de Syk et β -caténine dans les cellules Mec1..	110
Figure 24: Déplétion de Syk et b-catenine dans la lignée HG3.	112
Figure 25: Modulation de la phosphorylation de la tyrosine 142 de la β -caténine par Syk suite à une stimulation antigénique.....	113

Liste des tableaux

Tableau 1: Implication de Vav1 dans les tumeurs solides	24
Tableau 2 : Les principaux sites de phosphorylation de Syk, les kinases impliquées et l'impact fonctionnel de ces modifications sur Syk elle-même et sur la voie de signalisation.	34
Tableau 3: Syk un promoteur de tumeurs	41
Tableau 4: Syk un suppresseur de tumeurs	43
Tableau 5: Les gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine.	51
Tableau 6: les modifications post-traductionnelles de la β -caténine.....	53
Tableau 7 : Les dérégulations de la β -caténine dans quelques cancers d'origine épithéliale... ..	64
Tableau 8 : Les dérégulations de la β -caténine dans quelques hémopathies.	64

Liste des abréviations

A

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire

AKT : Protéine kinase B

APC : Adenomatous Polyposis Coli protein

ARN : Acide RiboNucléique

AXIN1 : L'axine1

B

Bcl2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B Cell Receptor

BHLH : Basic Helix-Loop-Helix

BLNK : B-cell Linker

BRAF : B-Raf sérine/thréonine kinase

Btk : Bruton Tyrosine kinase

C

Cbl :Casitas B-lineage Lymphoma

Cbl-B : Ubiquitine Ligase

CBY1 : Protéine Chibby 1

CD : Cluster de Différenciation

CD40L : CD40 Ligand

Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CK1 : Caseine kinase 1

CLR : Récepteurs aux Lectines de type C

c-MET : protéine tyrosine kinase Met

c-Myc : Proto-oncogène codé par le gène Myc

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRC : le carcinome colorectal

CSL : Cellules Souches Leucémique

CTD : Domaine C-Terminal

CTNNB1 : le gène qui code la protéine β -caténine

CXCL12 : CXC Motif Ligand 12

CXCR4 : CXC Motif Receptor 4

D

DAG : Diacylglycérol
DAP12 : Death associated protein 12
DH domaine : Dbl homology
DKK : Dickkopf
DLBCL : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B
Domaine AC : Acidic Motif
Domaine ARM : domaine Armadillo
Domaine CH : Calponin Homology
Domaine PH : Pleckstrin homology
DVL : Protéine Dishevelled

E

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ERK : Extracellular Regulated Kinase
ERM : Ezrine, Radixine et Moésine

F

Fc : Fragment cristallisable
FoxM1 : Forkhead-box
Foxo : Forkhead Gox Class O
FYN : Oncogene related to SRC, FGR, YES

G

GDP : Guanosine DiPhosphate
GEF : Guanine Exchange Factor
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 : Glycogen Synthase kinase 3 β
GTP : Guanosine TriPhosphate

H

HAT : Histones Acetyl Transférases
HCC : Carcinome Hépatocellulaire
HDAC : Histones Désacétylases
HIF1 α : Hypoxia Induced Factor 1 alpha
HMG : High Mobility Group

I

ID2 : Inhibitor Of DNA Binding 2

IDA : Interdomaine A
IDB : Interdomaine B
Ig : Immunoglobuline
Ikaros : Zinc-finger transcription factor
I κ B α e : Inhibitory kappa B
IKK : I κ B kinase
IP3 : Inositol TriPhosphate
ITAMs : Immunoreceptor tyrosine-based Activation Motifs
ITF2 : Immunoglobulin transcription factor 2
Itk : Interleukine 2 inducible T cell kinase

J

JAGGED 1 : Notch ligand (JAG1)
JNK : c-Jun N terminal Kinase

K

KO : knock-out
KRas : Kirsten rat sarcoma viral oncogene
K-ras : Kirsten rat sarcoma

L

LAL /T-ALL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LCM : Lymphome du Manteau
LEF : Lymphoid Enhancer binding Factor
LF : Lymphome Folliculaire
LGR5 : Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5
LLA-B : Leucémie Lymphoblastique Aigüe B
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LMP2A : Latent Membrane Protein 2A
LRP5/6 : Low Density Lipoprotein receptor related protein 5/6
LT : Lymphocyte T
LZM : Lymphome de la Zone Marginale

M

MAP kinases : Mitogen-Activated Protein
MCC : Mutated in Colorectal
MM : Myélome Multiple

MMP : Matrix MetalloProteinase

MPTs : Modifications post-traductionnelles

mRNA : Messenger RiboNucleic Acid

mTOR : mammalian Target of Rapamycin

N

NFAT : Nuclear Factor of Activated T cell

NF- κ B : Nuclear Factor kappa B

NLS : Nuclear Localization Signal

Notch1 ICN1 : Intracellular active fragment of Notch1

Notch1 : Gène humain codant pour un récepteur transmembranaire

NRCAM : Neuronal Cell Adhesion Molecule

NTD : Domaine N-Terminal

O

OCT4 : Octamer-binding Transcription factor 4

P

p53 : Proteine impliquée dans l'apoptose

PAK : P21 Activated Kinase

PAK1 : Phosphate-activated kinase 1

PEST : Séquence Peptidique Riche en Proline , acide glutamique, Sérine et Thréonine

PH domaine : Pleckstrin Homology

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol BiPhosphate

PKC : Proteine Kinase C

PKD : Protéine Kinase D

PKT : protéine-tyrosine kinases

PLC γ : Phospholipase C gamma

PP2A : Protéine Phosphatase 2

PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1

PTCL : Lymphome des Cellules T Périphériques

PTK : Protéine tyrosine kinase

R

Rac1 : Protéine G, codé par le gène Rac1

RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand

RapGEF5 : gène codant pour la protéine d'échange nucléotidique 5 de la guanine rap

RNP : RiboNucleoProteine

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

RTK : Receptor tyrosine kinases

S

SCCHN : Carcinome squameux de la tête et du cou

SCF : Skp, Cullin, F-box

SCLC : Cancer de poumon à petites cellules

SDF1/ CXCL12 : Stromal Cell-Derived Factor 1

SFKs : Src-family protein tyrosine kinases

SH : Scr Homology

SI : Synapse Immunologique

SLP76 : SH2-domain-containing Leukocyte Protein of 76 kDa

Snail : facteur de transcription à doigt de zinc codé par le gène SNAI1

Sox : SRY-related HMG-box gene

Syk : Spleen Tyrosine Kinase

T

TCF : T Cell Factor

TCR : T Cell Receptor

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TKI : Inhibiteur de Tyrosine Kinase

U

uPAR : urokinase-type Plasminogen Activator Receptor

V

Vav1 : Proto-oncogène codé par le gène Vav

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VIK : Vav1-interacting Kuppel-like protein

Z

ZAP70 : Zeta-chain-associated protein of 70 kDa

Zeb : Zinc E-box Binding factor

ZO3 : Zonula Occludens

β -TrCP : β -transducin repeats-Containing Protein

Introduction

Sur l'échelle mondiale des causes de mortalité, le cancer se place aujourd'hui en seconde position derrière les maladies cardiovasculaires. Pour autant, le cancer est devenu la première cause de mortalité dans les pays dits industrialisés ou très développés (Dagenais et al., 2020). Les données statistiques montrent que plus de 8.9 millions de décès et 17.2 millions de nouveaux cas sont recensés dans le monde chaque année soit une augmentation très significative (Fitzmaurice et al., 2018). Cet ensemble de pathologies que l'on regroupe sous le terme générique de cancer représente donc un énorme enjeu en santé publique mondiale. La compréhension de l'ensemble des mécanismes (moléculaires, cellulaires, environnementaux...) impliqués dans le développement et la progression de cette maladie est donc toujours indispensable afin de développer de nouvelles approches préventives, de diagnostic et surtout thérapeutiques.

Le cancer a la capacité d'affecter tous les tissus. Classiquement, on associe/caractérise cette maladie par une prolifération incontrôlée d'une ou plusieurs populations cellulaires. Cependant, avant de devenir pleinement tumorigène, une cellule doit subir plusieurs étapes distinctes lui permettant de proliférer et d'envahir les tissus sains. Deux revues majeures, écrites par les Dr Douglas Hanahan et Robert Weinberg, tentent de répertorier les caractéristiques majeures et communes de la cellule cancéreuse.

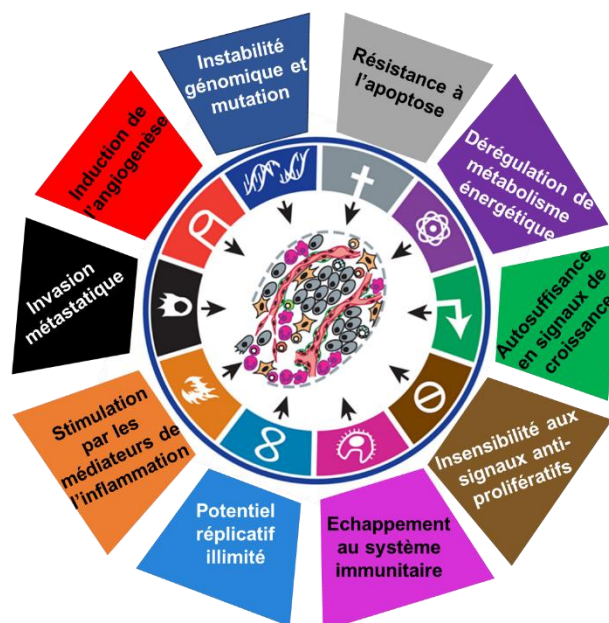


Figure 1 : les différentes caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses. Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2000)

L'autosuffisance en termes de signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la résistance à l'apoptose, un potentiel répliatif illimité, l'induction de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases ont été les six premières caractéristiques identifiées (Hanahan and Weinberg, 2000). Une décennie plus tard, ils mettaient en évidence quatre caractéristiques partagées par les cellules cancéreuses : la dérégulation des voies métaboliques, l'instabilité génomique et les mutations génétiques, l'inflammation qui favorise la progression tumorale et enfin l'échappement à la reconnaissance par le système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 1).

La signalisation cellulaire est un acteur majeur au centre de ces dérégulations. Hanahan et Weinberg ont distingué différents grands circuits de signalisation altérés dans les cellules cancéreuses : la motilité, la viabilité, la prolifération et l'inhibition de la croissance et la division cellulaire (Figure 2).

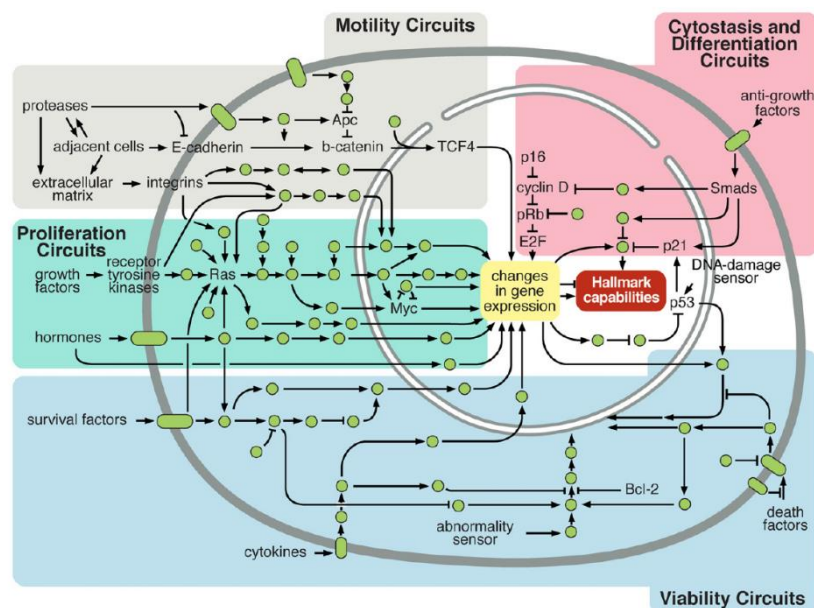


Figure 2 : Les quatre grands circuits de signalisation altérés dans les cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011).

La motilité cellulaire implique notamment des molécules d'adhérence comme les cadhérines et les intégrines, des molécules contrôlant l'organisation du cytosquelette (RhoGTPase) ainsi que des effecteurs comme la β -caténine. Le contrôle de la viabilité cellulaire est assuré aussi bien par des récepteurs dont ceux aux cytokines et un ensemble de facteurs pro ou anti-apoptotiques. La prolifération et la croissance cellulaires sont également régulées par

un tout un ensemble de signaux anti- ou pro-prolifératifs associés à des récepteurs membranaires.

Dans ces circuits de signalisation, les signaux, en grande partie ceux émis par les récepteurs des facteurs de croissance, sont traités dans le cytoplasme pour être transmis ensuite au noyau pour la mise en place de l'expression d'un ensemble de gènes en adéquation avec le signal reçu. Une seule cellule peut exprimer au moins 20000 protéines distinctes, dont beaucoup sont activement impliquées dans les circuits de régulation cytoplasmique. Ces protéines régulatrices se trouvent à différents endroits dans le cytoplasme mais également à différentes concentrations. Ces protéines doivent communiquer avec spécificité et précision pour transmettre le signal. Par conséquent, une protéine de signalisation opérant dans une cascade de signalisation doit reconnaître uniquement les signaux provenant de ses protéines partenaires en amont et les transmettre à ses partenaires en aval. Beaucoup d'oncoprotéines ont la capacité de générer des déséquilibres de signalisation dans des systèmes normalement finement régulés. Si le cancer est communément caractérisé comme une maladie associée à une prolifération cellulaire inappropriée, il peut être surtout caractérisé comme une maladie associée à un traitement aberrant du signal.

Si l'on veut comprendre le fonctionnement d'une cellule cancéreuse, il est encore aujourd'hui indispensable d'identifier et de caractériser l'ensemble des acteurs de la signalisation cellulaire. En ce sens, ce travail est consacré aux fonctions de trois acteurs majeurs de la signalisation cellulaire dans la cellule cancéreuse : la β -caténine, la kinase Syk et le facteur d'échange Vav1.

I. Le Facteur d'échange nucléotidique Vav1

1. Généralités

Historiquement, la protéine Vav1 a été découverte en 1989 par Shulamit Katzav sous une forme oncogénique, lors de travaux portant sur le criblage de gènes responsables de carcinomes dans le laboratoire du Dr Mariano Barbacid (Katzav et al., 1989). Cette première forme de Vav1 isolée était en fait une protéine tronquée, résultant de la délétion des premiers 67 acides aminés de la partie N-terminale. Nommée onco-Vav1, cette forme possède un fort potentiel transformant lié à l'absence de régulation de sa fonction GEF (Guanine Exchange Factor) rendue constitutivement active. Peu de temps après, la forme sauvage de Vav1 ainsi que ces deux homologues Vav2 et Vav3 ont été ensuite identifiées chez les vertébrés (Coppola et al., 1991; Katzav et al., 1991). Ces deux dernières ont des domaines structuraux homologues à Vav1 (Trenkle et al., 2000). Si l'expression de Vav2 et Vav3 est ubiquitaire, celle de Vav1 est restreinte/confinée exclusivement au lignage hématopoïétique. Cependant, les trois membres conservent des fonctions cellulaires identiques : ils sont à la fois des facteurs d'échange nucléotidique sur les petites GTPases Rho et des adaptateurs dans les voies de signalisation.

Ces protéines se comportent donc comme des commutateurs moléculaires dépendants de leur état de phosphorylation, variant entre un état inactif (non phosphorylé) et une conformation active (phosphorylée). Les trois membres de la famille Vav jouent des rôles clés dans de nombreux processus biologiques contrôlés par l'activité de protéines tyrosine kinases (PTK) à la fois chez les invertébrés et les vertébrés. Ils participent activement à l'homéostasie du système nerveux central, du système cardiovasculaire et du système immunitaire mais aussi à plusieurs pathologies telles que le cancer et les pathologies du système immunitaire (Bustelo, 2014).

2. Structure de Vav1

La protéine Vav1 est composée de multiples domaines fonctionnels qui lui permettent d'assurer ses deux grandes fonctions (Figure 3)

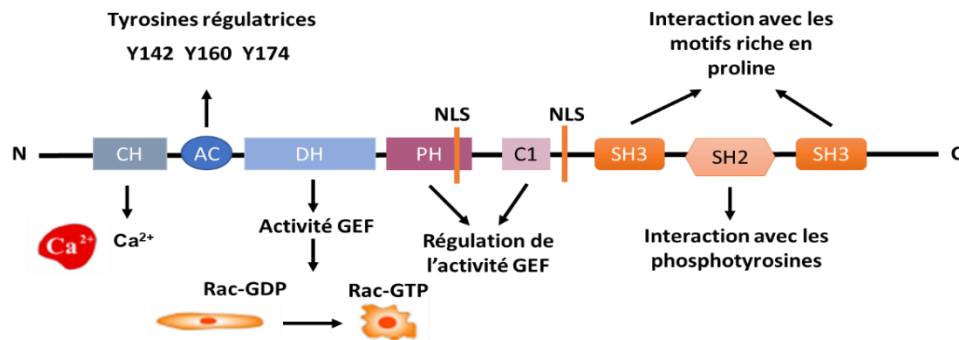


Figure 3: Structure de Vav1. Domaine CH (calponin homology) ; domaine AC (Acidic) qui contient trois tyrosines régulatrices ; un domaine DH (DBL homology) ; un domaine PH (Pleckstrin homology) ; un domaine C1 ; une région riche en proline (-PPPP-) ; deux séquences de localisation nucléaire NLS ; deux domaines SH3 et un domaine SH2 (Scr homology). La fonction de chaque domaine est indiquée sur la figure adaptée de (Katzav, 2009)

Vav1 est constitué dans sa région N-terminale d'un domaine CH (Calponin Homology), fréquemment retrouvé en tandem dans les protéines interagissant directement avec l'actine mais dans le cas présent joue plutôt un rôle dans la mobilisation du calcium intracellulaire. La déplétion d'une partie de ce domaine génère la forme oncogénique onco-Vav1 capable d'induire la transformation des fibroblastes NIH3T3. La déplétion totale du domaine CH conduit à une activation constitutive de la fonction GEF de Vav1 (Coppola et al., 1991; Katzav et al., 1991).

Cette fonction est régulée par le domaine AC (Acidic motif) qui contient trois tyrosines dites régulatrices (Y142, Y160 et Y174). Ces tyrosines sont en effet essentielles pour l'activation de Vav1 et sa fonction de facteur d'échange porté par le domaine DH. Vav1 est d'ailleurs le seul GEF dont l'activité est régulée par la phosphorylation de tyrosines (López-Lago et al., 2000). La déplétion du domaine AC active constitutivement Vav1 et augmente également sa capacité transformante des NIH3T3. L'activité GEF de Vav1 est catalysée par le domaine DH (Dbl homology), qui assure l'échange d'un GDP en GTP au niveau de la famille des petites GTPases Rho dont Rac1 et Cdc42 (Bustelo, 2000; Rapley et al., 2008). Ces domaines sont suivis par un domaine PH (Pleckstrin homology domain) qui permet la liaison aux phospholipides membranaires et assure le recrutement de Vav1 à la membrane. Les domaines PH et C1 participent également à la régulation de l'activité GEF de Vav1.

Vav1 dispose aussi de deux séquences de localisation nucléaire NLS lui permettant de transiter entre le cytoplasme et le noyau. Seule l'une des deux (dans le domaine PH) a été montrée fonctionnelle. La protéine Vav1 possède deux domaines SH3 (N-SH3 et C-SH3), le domaine C-SH3 étant consensuel. De manière habituelle, les domaines SH3 reconnaissent les

séquences PRR des protéines partenaires et contribuent à la transduction du signal via des interactions protéine/protéine. Le domaine C-SH3 de Vav1 médie d'ailleurs l'interaction avec différents partenaires dont certains transitent entre cytoplasme et noyau. Le domaine SH2 est responsable d'interactions avec de nombreuses protéines phosphorylées sur tyrosines, dont certaines kinases, des adaptateurs ou des régulateurs négatifs. Cette cassette SH3-SH2-SH3 joue donc un rôle de plateforme dans les interactions protéiques ce qui favorise leur recrutement au niveau des récepteurs, d'effecteurs de la signalisation (comme les kinases).

3. Dualité fonctionnelle de Vav1 dans la signalisation cellulaire

Vav1 possède une double fonction, elle est à la fois un facteur d'échange GDP/GTP (GEF) pour les petites GTPases Rho et un adaptateur dans les voies de signalisation.

3.1. La fonction GEF et sa régulation par phosphorylation

Les facteurs d'échange nucléotidique ou GEF sont des protéines assurant l'échange de guanosine diphosphate GDP en guanosine triphosphate GTP de la famille des petites GTPases Rho. Les GTPases Rac1, RhoA et cdc42 sont les trois membres de la famille Rho connues pour leur rôle dans le remaniement du cytosquelette d'actine au cours de la migration, l'adhérence et l'invasion cellulaires (Rossman et al., 2005).

Vav1 exerce son activité GEF préférentiellement sur Rac1 *in vitro* et *in vivo* (Movilla et al., 2001), et a une efficacité plus faible sur Cdc42 et RhoA. Le domaine DH de Vav1 assure l'activité GEF avec la contribution des autres domaines structuraux. En effet, La structure à haute résolution des domaines DH/PH/C1 de Vav1 en complexe avec Rac1 a montré que les domaines PH et C1 contribuent à une activité GEF efficace en stabilisant la structure du domaine DH (Rapley et al., 2008).

L'activation de la fonction GEF est contrôlée par la phosphorylation de trois tyrosines régulatrices (Y160, Y142, Y174) phosphorylées par les RTKs ou des kinases cytoplasmiques. Leur état de phosphorylation contrôle l'état conformationnel de Vav1 qui oscille entre deux formes : une conformation fermée (auto-inhibée) et une conformation ouverte (active). Une fois les tyrosines phosphorylées, le domaine catalytique DH est libéré ce qui permet l'activation complète de la protéine (Figure 4).

La conformation auto-inhibée de Vav1 est assurée par les domaines AC, DH, C1 et PH. En effet, le domaine AC interagit avec le domaine catalytique DH en bloquant l'accès à son

substrat. Les domaines PH, CH, C1 et C-SH3 viennent consolider la conformation fermée et contribuent à l'auto-inhibition de Vav1.

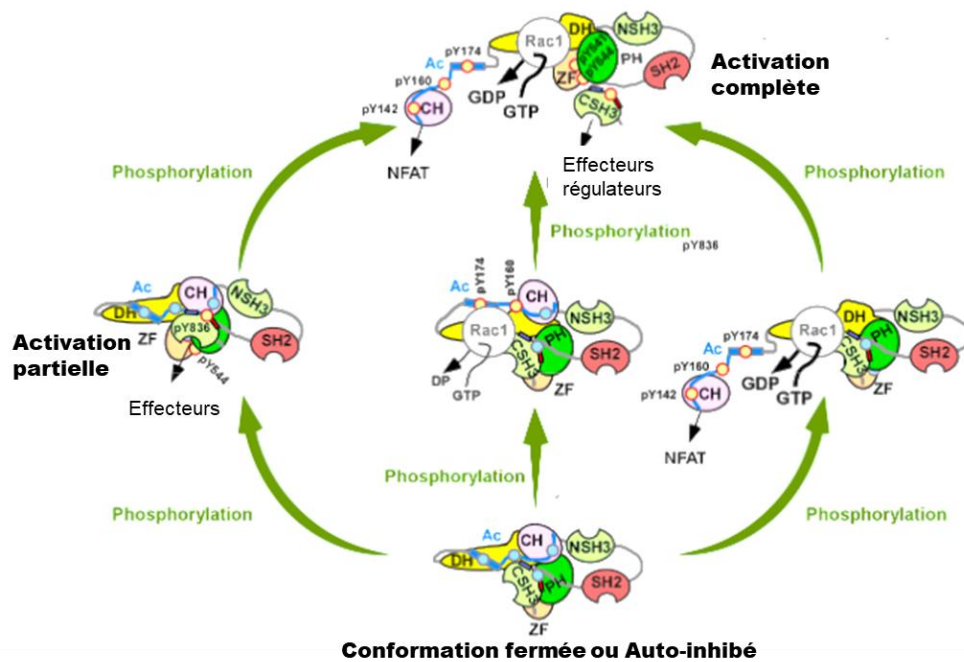


Figure 4: les différents états conformationnels de Vav1 liés à sa phosphorylations. Adaptée de (Barreira et al., 2014)

La stimulation des récepteurs membranaires tels que le BCR, TCR, Intégrines et les RTKs ou bien l'activation de tyrosines kinases cytoplasmiques, entraîne la pré-phosphorylation de Vav1 sur les tyrosines 160 et 142 favorisant par la suite sa phosphorylation sur la tyrosine 174 par les kinases de la famille Syk (Syk et ZAP70) (Deckert et al., 1996). La phosphorylation de la Tyr 174 provoque la libération du domaine DH ce qui lève l'auto-inhibition de la protéine Vav1 et aboutit à une augmentation de son activité GEF (Aghazadeh et al., 2000; López-Lago et al., 2000).

D'autres résidus tyrosines contribuent également à la régulation de l'activité GEF notamment les Y826 et Y841 présentes dans le domaine C-SH3 (Lazer et al., 2010). Plus récemment, trois autres sites de phosphorylations clés pour l'activation ont été mis en évidence : les résidus Y541 et Y544 dans le domaine C1 et Y836 dans le domaine C-SH3. L'état de phosphorylation de Y836 et, dans une moindre mesure, de ceux de Y541 et du Y544, contribue à la régulation de l'activité du Vav1 en lien avec les tyrosines présentes dans la région AC. La phosphorylation de ces trois nouvelles tyrosines est indispensable à la levée de l'auto-inhibition contrôlée par le domaine C-SH3 (Barreira et al., 2014; Barreira et al., 2018).

L'activation de Vav1 est donc contrôlée par la phosphorylation par un ensemble de tyrosines présentes dans les domaines AC, C1 et C-SH3 ce qui conduit *in fine* à un réarrangement du

cytosquelette d'actine dans les cellules. Si Vav1, en tant que GEF, est un acteur clé de la signalisation ; il y participe également via sa fonction adaptatrice lui permettant de s'associer à de nombreuses protéines.

3.2. La fonction adaptatrice de Vav1 dans le contrôle de la signalisation et des fonctions cellulaires

Les domaines d'interaction protéine-protéine de Vav1 sont essentiels à son fonctionnement dans la cellule (Bustelo, 2000). Bien que les conséquences de toutes ces interactions ne soient pas encore totalement connues, la capacité de Vav1 à interagir avec de nombreuses protéines lui permet probablement de contribuer à plusieurs voies de signalisation (Rodríguez-Fdez and Bustelo, 2019) (Figure 5).

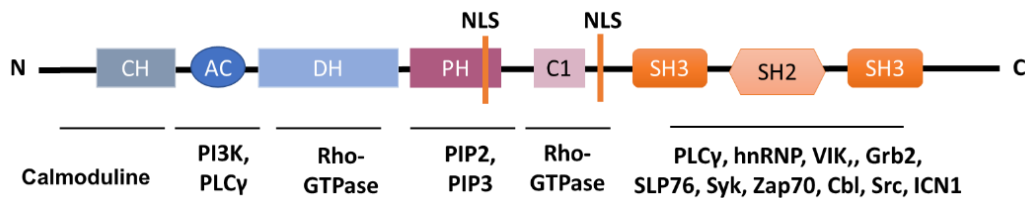


Figure 5: Quelques protéines partenaires de Vav1.

La fonction de Vav1 la plus ancienne connue est la contribution à la réorganisation du cytosquelette dans les LTs en réponse à la stimulation du complexe TCR/CD3 par un peptide antigénique présenté à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA). L'activation complète du LT nécessite la formation d'une zone d'interaction forte entre le LT et la cellule CPA appelée « synapse immunologique » (SI). L'implication de Vav1 dans la formation des SI a été rapportée pour la première fois dans des LTs issus de souris déficientes en Vav1 (Vav1^{-/-}). Bien que les souris soient viables, elles souffraient d'une réorganisation altérée du cytosquelette au niveau des LTs probablement due à un défaut de polymérisation d'actine et de focalisation des radeaux lipidiques. De plus, ces LTs n'étaient pas capables d'assurer le recrutement et l'ancrage des TCRs nécessaires à son activation (Fischer et al., 1998; Krawczyk et al., 2002).

Par ailleurs, grâce à la présence de séquences de localisation nucléaire Vav1 peut également interagir avec de nombreux partenaires transitant entre le cytoplasme et le noyau telles que les ribonucléoprotéines hnRNP impliquées dans la maturation des ARN ou la protéine VIK (Vav1-interacting Kuppel-like protein) qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire (Hobert et al., 1994; Houlard et al., 2005).

Vav1 participe également à la régulation de certains facteurs de transcription tels que NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) ou NF- κ B (Nuclear Factor kappa B)(Houlard et al., 2002). La concentration en calcium intracellulaire est un facteur déterminant du niveau d'activation des facteurs de transcription NFAT. Le domaine CH de Vav1 est quant à lui associé à la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires après activation de la PLC- γ (Cao et al., 2002).

Vav1 intervient donc d'une part au cours de l'activation de l'axe PI3K/Rac1/Itk (Interleukine 2 inducible T cell kinase, une kinase de la famille Tec) afin d'activer la PLC- γ 1 et d'autre part dans la régulation de l'interaction entre SLP76 et PLC- γ 1(Reynolds et al., 2002). L'activation de PLC- γ permet le clivage de PIP2 en DAG (Diacylglycérol) et IP3 (Inositol triphosphate). Le DAG active les protéines kinase C (PKC) tandis que l'IP3 est responsable de la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique. L'augmentation de calcium intracytoplasmique permet l'activation de la calmoduline qui en se fixant à la calcineurine permet un changement conformationnel libérant l'activité Ser/Thr phosphatase de cette dernière. La calcineurine va ainsi déphosphoryler le facteur de transcription NFAT qui pourra alors être transporté vers le noyau et interagir avec ses partenaires de transcription.

Si Vav1 et Vav3 favorise la libération du calcium intracellulaire en aval du TCR via l'implication de son inter domaine qui lie l'extrémité C-terminal et le domaine C1, l'absence de ce dernier dans la structure de Vav2 inhibe la signalisation calcique dans les cellules T (Fray et al., 2020).

Dans la voie NF- κ B, Vav1 interagit avec le complexe kinases IKKs qui lui-même va réguler la dégradation de l'inhibiteur I κ B par le protéasome et permettre le passage au noyau et l'activation transcriptionnelle de NF- κ B (Piccolella et al., 2003). Ainsi, La déplétion de Vav1 engendre un défaut de dégradation de I κ B α et par conséquent d'activation de NF- κ B.

Récemment, une nouvelle fonction adaptatrice de Vav1 a été mise en évidence dans la régulation négative de la voie Notch. Vav1, *via* ses domaines SH3, favorise l'interaction du fragment actif de Notch1 ICN1 (Intracellular active fragment of Notch1) avec l'ubiquitine ligase Cbl-B facilitant ainsi sa dégradation par le protéasome (Robles-Valero et al., 2018; Robles-Valero et al., 2017).

Ces études montrent des différences marquées dans les fonctions de Vav1 par rapport à ces deux isoformes Vav2 / Vav3, et pourrait expliquer l'expression différentielle des membres de la famille Vav par les cellules normales ou tumorales.

4. Implication de Vav1 dans les cancers

Lors de la découverte de la forme oncogénique onco-Vav1, l'ADNc était tronqué et générait une protéine délétée des 67 premiers acides aminés dans la partie N-terminale. Cette forme, possédait de fortes propriétés transformantes dans les fibroblastes NIH3T3. Cependant cette forme tronquée n'a jamais été identifiée chez des patients atteints de cancer. Par la suite, Vav1 a été caractérisé comme un effecteur de signalisation essentiel dans le système hématopoïétique, où il est normalement exclusivement exprimé. Pour autant, les recherches développées sur Vav1 au cours des deux dernières décennies ont mis en évidence son implication dans différentes tumeurs malignes humaines allant des hémopathies aux carcinomes (Katzav, 2015).

4.1. Vav1 dans les hémopathies malignes.

Vav1 joue un rôle important dans le développement des cellules immunitaires et sa participation a été démontrée dans plusieurs hémopathies. Il est d'ailleurs souvent assumé que Vav1, en tant que Rho -GEF, est impliqué dans de nombreuses voies pro-tumorigènes.

En premier lieu, la dérégulation de l'expression du gène *VAV1* peut participer à la transformation tumorale. Par exemple, les niveaux élevés de Vav1 détectés dans la lignée Jurkat, modèle de leucémie aigüe de cellules T, sont associés à la surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl2. Vav1 protégerait donc les cellules leucémiques de l'apoptose *via* l'activation de l'expression de Bcl2 (Yin et al., 2011).

Dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), la surexpression de Vav1 est observée dans les cellules de patients qui présentent la délétion 13q (Prieto-Sánchez et al., 2006). Vav1 en participant à la propagation du signal en aval du BCR favoriserait la prolifération des cellules leucémiques. Vav1 participerait également à la signalisation du récepteur CXCR4 en activant RhoA et en favorisant la motilité cellulaire (Hofbauer et al., 2014). Dans les cellules de lymphome diffus à grandes cellules B, l'expression de Vav1 est associée à une activité proliférative plus élevée et pourrait éventuellement servir de marqueur pour les tumeurs susceptibles de répondre aux thérapies basées sur le CD40L (Hollmann et al., 2010).

En 2016, deux groupes différents ont mis en évidence la présence de protéines dont le gène est en fusion avec celui de Vav1 (Vav1-THAP4, Vav1-MYO1F et Vav1-S100A7) résultant de translocations dans les lymphomes T périphériques. Ces altérations génétiques entraînent l'activation accrue des fonctions GEF et adaptatrice de Vav1. Des mutations pro-oncogéniques ont également été identifiées aboutissant à une activation constitutive de Vav1 (Abate et al., 2017; Boddicker et al., 2016). Enfin, une translocation et des mutations induisant l'activation constitutive de Vav1 ont aussi été détectées dans les lymphomes T angioblastiques (Fujisawa et al., 2018). Ces résultats illustrent un nouveau mode de dérégulation de Vav1, mutations récurrentes et translocation-fusion, dans des lymphomes T.

Beaucoup plus récemment, il a été élégamment démontré pour la première fois un rôle suppresseur de tumeur de Vav1 dans la leucémie aiguë lymphoblastique T (LAL ou T-ALL). Il a en effet été découvert que les souris *Vav1*^{-/-} développent un sous-type de T-LAL au cours du vieillissement ou bien lors de traitement par des agents cancérogènes. Le mécanisme moléculaire sous-jacent relie les GEFs avec la voie Notch, très souvent altérée dans ce type de leucémie. Vav1 fonctionne donc comme un suppresseur de tumeur, indépendamment de son activité catalytique, grâce à son association avec l'ubiquitine ligase Cbl-b et le domaine intracellulaire de Notch1 (ICN1). L'ubiquitination d'ICN1 induit sa dégradation et bloque sa capacité à transiter vers le noyau et participer à l'expression de certains gènes (Bustelo et al., 2018; Robles-Valero et al., 2017).

4.2. Vav1 et tumeurs solides.

Si l'expression de Vav1 est normalement restreinte au lignage hématopoïétique, son expression ectopique a tout d'abord été détectée dans les neuroblastomes (Hornstein et al., 2003). Suite à ces travaux, la liste des différents types de cancers exprimant Vav1 n'a cessé de s'allonger : le médulloblastome (Lindsey et al., 2015), le cancer de poumon (Lazer et al., 2009), le cancer du sein (Sebban et al., 2013), le cancer de l'œsophage (Zhu et al., 2017), le cancer du pancréas (Fernandez-Zapico et al., 2005; Razidlo et al., 2015) et le cancer de l'ovaire (Wakahashi et al., 2013).

Tableau 1: Implication de Vav1 dans les tumeurs solides

Type de cancer	Observations biologiques	Références
Medulloblastome	Expression ectopique due à une hypométhylation du promoteur.	(Lindsey et al., 2015)

Neuroblastome	Expression ectopique.	(Hornstein et al., 2003) (Betz et al., 2003)
Mélanome	Expression ectopique- Activation par CXCL12 (SDF1). Régulation de l'expression par BRAF ^{V600E}	(Bartolomé et al., 2006) (Ko et al., 2020)
Ovaire	Expression ectopique Régulation positive de l'EMT	(Wakahashi et al., 2013)
Pancréas	Expression ectopique. Surexpression de la cycline D1 Invadopodia-Métastases Synergie avec K-ras	(Fernandez-Zapico et al., 2005) (Razidlo et al., 2014) (Razidlo et al., 2015) (Huang et al., 2017) (Salaymeh et al., 2020) (Grassilli et al., 2020)
Sein	Expression ectopique Localisation nucléaire prédominante Inhibition de l'expression d'AKT	(Sebban et al., 2013) (Du et al., 2014) (Grassilli et al., 2014) (Grassilli et al., 2018)
Poumon	Expression ectopique Intégration des signaux du microenvironnement	(Lazer et al., 2009) (Qi et al., 2015)

Ces différentes études montrent que la réexpression de Vav1 et par la même l'activation de ses deux fonctions, adaptatrice et GEF, contribue à la tumorigénèse en participant à la prolifération, la transformation, la migration et l'invasion cellulaires (Katzav, 2015). Lorsque cela a pu être analysé, l'expression ectopique de Vav1 est associée à un mauvais pronostic avec l'exception notable du cancer du sein. Il est donc possible, mais cela reste à confirmer, que Vav1 puisse être à la fois un oncogène et un suppresseur de tumeur comme récemment montré dans certaines hémopathies.

Les travaux cités précédemment se sont concentrés principalement sur l'étude des mécanismes de réexpression ou bien du mode d'action de Vav1 dans les tumeurs solides. Plus récemment, le séquençage du génome dans différentes pathologies indique que Vav1 est muté dans approximativement 1% des cancers humains (Campbell et al., 2016; Farago et al., 2020; Shalom et al., 2018). Les mutations identifiées dans Vav1 se répartissent sur l'ensemble du gène et affectent (ou non) tous les domaines structuraux de la protéine.

Parmi ces mutations, la mutation ponctuelle du résidu D797N spécifique au domaine C-SH3 de Vav1, induit la transformation de fibroblastes 3T3 ainsi que la formation de tumeurs

dans des modèles murins. Ce mutant favorise la réorganisation du cytosquelette d'actine *via* l'activation de Rac1. Par ailleurs, cette analyse a mis en évidence une interaction entre Vav1 et la β -caténine suggérant une contribution de Vav1 aux jonctions cellulaires et à la stabilisation de la β -caténine (Razanadrakoto et al., 2015b). Dernièrement, le groupe du Pr. Shulamit Katzav a étudié trois mutations les plus fréquemment observées chez des patients atteints de cancer du poumon. Deux des trois mutants se sont révélés très fortement transformants suggérant que des mutants ponctuels de Vav1 peuvent être de puissants oncogènes par rapport à la forme sauvage (Farago et al., 2020).

II. La tyrosine kinase Syk

1. Généralités

La protéine Syk (Spleen Tyrosine Kinase) est une tyrosine kinase cytoplasmique appartenant à une famille de kinases constituée de deux membres : Syk et Zap70. Ces deux kinases ont été principalement décrites et étudiées pour leur rôle primordial dans la signalisation des récepteurs immuns matures TCR et BCR ainsi que dans le développement lymphocytaire. Syk est majoritairement exprimée par les cellules hématopoïétiques mais également à des niveaux variables dans des cellules non hématopoïétiques (Yanagi et al., 2001) (Figure 6).

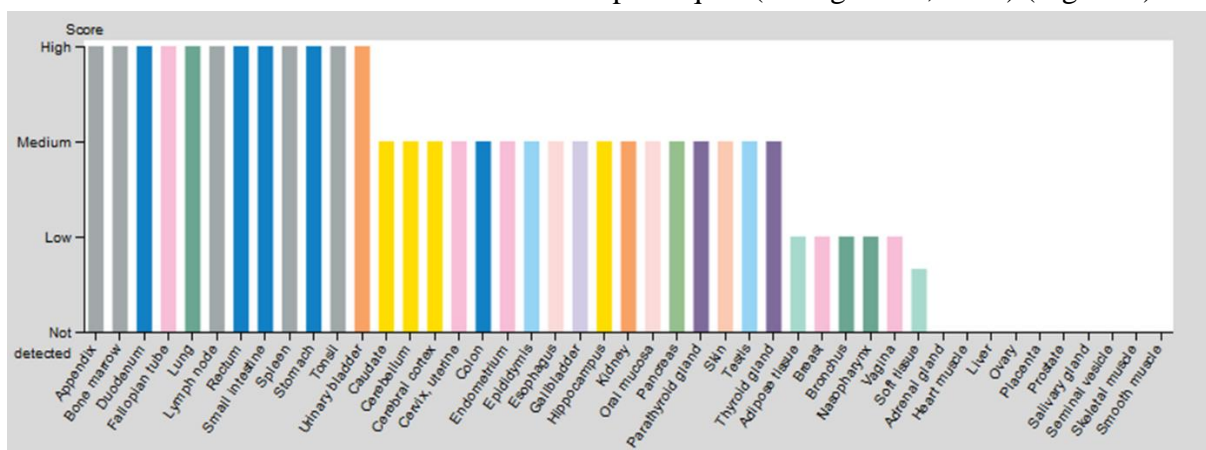


Figure 6: Expression tissulaire de Syk. Les niveaux d'expressions de Syk sont très variables d'un tissu à un autre, une forte expression dans le poumon, la rate, la moelle osseuse, une expression moyenne dans le colon, le rein, le pancréas, la thyroïde et une faible expression dans le sein et le tissu adipeux. (The human protein atlas database www.proteinatlas.org).

L'importance de Syk dans le développement a été démontrée dès 1995 par deux équipes grâce à la génération des premiers modèles murins invalidés. L'invalidation du gène *Syk* chez la souris induit une létalité périnatale suite à des hémorragies cutanées causées par une mauvaise

séparation des systèmes sanguins et lymphatiques. De plus, des altérations de la maturation précoce des lymphocytes B ont été observées (Cheng et al., 1995; Turner et al., 1995).

En fonction du type cellulaire, Syk participe à de très nombreuses voies de signalisation notamment celles initiées par le récepteur des cellules B (BCR ou B Cell Receptor), le récepteur des cellules T (TCR ou T Cell Receptor), les récepteurs plaquettaires, les récepteurs aux lectines C, les récepteurs aux cytokines, les récepteurs Fc (Fragment constant des immunoglobulines) ou les intégrines (Berton et al., 2005). Ces voies de signalisation contrôlent plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la différenciation, la mobilisation du calcium, la production de cytokines ou encore la survie des cellules.

2. Structure primaire de Syk

La structure primaire de Syk contient deux domaines d'homologie à Src (SH2), qui sont organisés en tandem à l'extrémité N-terminale et permettent à Syk d'interagir avec les récepteurs membranaires. Elle est également composée d'un domaine catalytique à l'extrémité C-terminale qui assure la fonction kinase (Taniguchi et al., 1991). Les deux domaines SH2 sont séparés par un court interdomaine A (IDA) qui confère à Syk une flexibilité lors de sa liaison aux récepteurs (Zhang et al., 2008). Un autre interdomaine B (IDB), plus long que le précédent, se trouve entre le second domaine SH2 et le domaine kinase et constitue une plateforme d'interaction avec d'autres partenaires, notamment suite à la phosphorylation de certains de ses résidus (Figure 7).

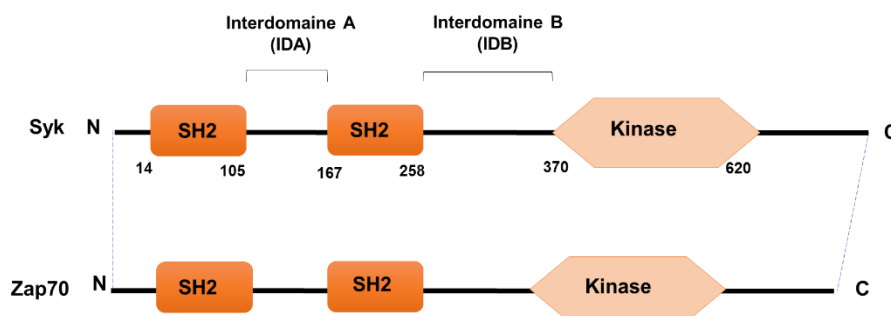


Figure 7: Structure primaire des protéines Syk et Zap70. Les protéines de la famille Syk sont constituées de deux domaines d'homologie à Src (SH2) séparés par un interdomaine A (IDA) et d'un domaine kinase séparé du tandem SH2 par un interdomaine B (IDB). Zap70 a perdu une séquence de 23 acides aminés (aa) située dans l'interdomaine B.

3. Isoformes de Syk

Le gène Syk, localisé sur le chromosome 9q22, permet l'expression de deux isoformes issues d'un épissage alternatif : Syk (L) et Syk (S). La forme longue (L, Long de 635 aa) et la forme courte (S, Short de 612 aa) diffèrent de 23 acides aminés situés dans l'interdomaine B ;

zone appelée « insert » (Ku et al., 1994). La déplétion de cet « insert » par épissage alternatif produit Syk (S) dont la séquence se révèle être plus similaire à celle de Zap70, lui aussi dépourvu de ces 23 aa (Figure 8). L'absence de l'insert diminuerait davantage la capacité de Syk (S) à se lier aux résidus phosphorylés des motifs ITAMs (Immunoreceptor tyrosine-based Activation Motifs) suite à une stimulation des récepteurs Fc des basophiles ou du TCR des cellules T (Latour et al., 1998).

Si l'expression différentielle des deux isoformes est relativement peu étudiée, des données indiquent que Syk (S) est faiblement exprimée par les cellules du thymus et de la rate ainsi que par certaines autres cellules hématopoïétiques. Syk (S) ne possède pas les résidus sérines S291 et S297 impliqués dans le contrôle des fonctions de Syk. La phosphorylation de la sérine 291 par la PKC activée en aval du BCR régule positivement les facteurs de transcription NFAT et Elk dans un modèle de cellules B (Paris et al., 2010). La phosphorylation de la S297 également par la PKC sert de rétrocontrôle à l'activation de Syk en aval du BCR (Makhoul et al., 2019; Mohammad et al., 2016). L'absence de ses deux résidus pourrait partiellement expliquer les différences observées entre les deux isoformes au niveau de la signalisation cellulaire en aval du BCR.

Concernant la localisation intracellulaire, Syk (L) se trouve à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau contrairement à Syk (S) qui est exclusivement cytoplasmique dans des cellules épithéliales mammaires (Wang et al., 2003). Néanmoins, une étude plus récente contradictoire montre que Syk (S) serait également retrouvé dans le noyau. Ainsi, la séquence d'acides aminés de 332 à 359 à l'extrémité C-term de l'IDB serait responsable de la translocation nucléaire de Syk dans la lignée DT40 de cellules B (Zhou et al., 2006).

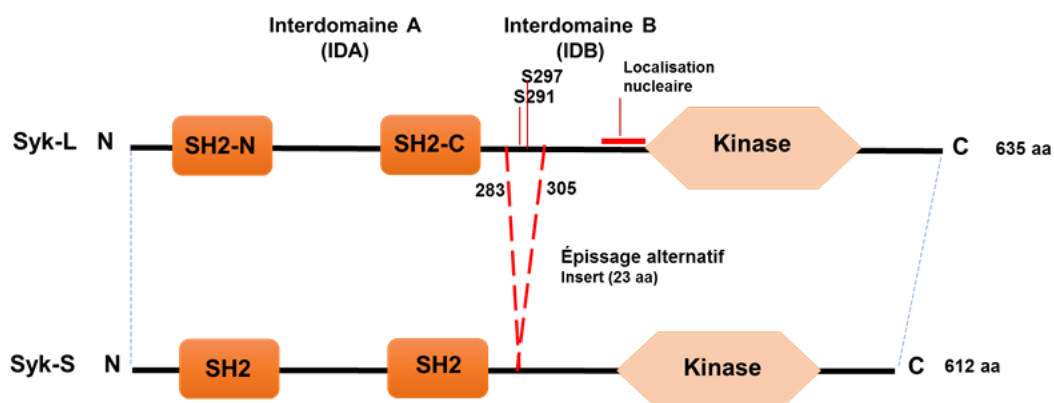


Figure 8: Les isoformes de Syk. L'isoforme Syk-L (Long, 635 acides aminés) diffère d'une séquence de 23 acides aminés incluant les sérines 297 et 291 de son isoforme Syk-S (Short, 612 acides aminés). Les isoformes possèdent une séquence de localisation nucléaire NLS proche du domaine kinase

Les données concernant l'expression et la distribution cellulaire de Syk commencent seulement à être mieux identifiées et semblent hétérogènes en fonction du type cellulaire. D'autre part les domaines modulaires de Syk lui permettent d'exercer une double fonction dans les voies de signalisation, à savoir une activité tyrosine kinase et une fonction d'adaptateur de signalisation.

4. La double fonction de Syk dans les voies de signalisation

4.1. La dualité de la fonction kinase

La protéine Syk est essentiellement décrite pour son activité enzymatique tyrosine kinase. Une fois activée par phosphorylation, elle phosphoryle à son tour de nombreuses protéines en aval de différents récepteurs membranaires participant à la propagation du signal (Geahlen, 2009). De façon surprenante, il a été également montré que Syk aurait la capacité de phosphoryler des substrats sur des résidus sérines. En effet, Syk phosphoryle le résidu sérine 197 (S197) de la sous-unité Ig α (CD79A) du BCR et régule ainsi négativement la signalisation du récepteur (Heizmann et al., 2010). Cette activité sérine kinase a aussi été mise en évidence sur le facteur de transcription Ikaros, facteur clé impliqué dans le développement lymphocytaire. La phosphorylation de résidus sérine présents dans l'extrémité C-term d'Ikaros favorise sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle dans des cellules pré-B (Uckun et al., 2012)

4.2. Un adaptateur

En complément de son activité kinase, Syk est décrite pour former une plateforme d'ancrage. Elle joue donc un rôle adaptateur en s'associant à de nombreux effecteurs protéiques impliqués dans diverses voies de signalisation. Son rôle adaptateur a été mis en évidence suite à l'expression de mutants de Syk qui altèrent son activité kinase mais pas la signalisation en aval. Par exemple, l'extrémité C-term de Syk contient deux résidus tyrosine qui une fois phosphorylés vont permettre l'interaction avec BLNK (B-cell linker ou SLP65). La co-expression de BLNK et de Syk sans activité kinase (Syk-KD) dans la ligné T J14 a montré que Syk pouvait établir un lien entre BLNK et la mobilisation du calcium indépendamment de son activité kinase suite à la stimulation du TCR (Abudula et al., 2007; Kulathu et al., 2008).

5. Rôle de Syk dans la signalisation cellulaire

5.1. Syk et la voie du BCR

Le rôle de Syk dans la signalisation en aval des récepteurs immuns a été largement étudié dans le système hématopoïétique. Ces récepteurs exprimés à la surface des cellules possèdent des motifs ITAMs qui sont des motifs d'activation contenant plusieurs tyrosines. Syk se fixe par l'intermédiaire de ses deux domaines SH2 aux résidus tyrosine des motifs ITAMs qui ont été phosphorylés par les kinases de la famille Src (SFKs) (Mócsai et al., 2010)(Figure 9).

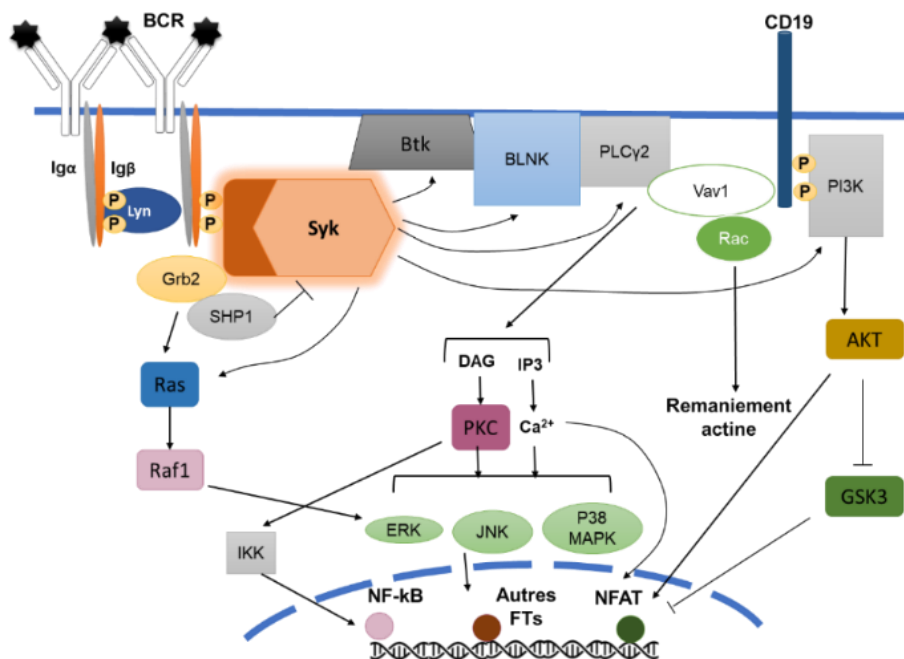


Figure 9: Activation de Syk en aval de la signalisation du BCR. La transduction du signal en aval de l'activation de Syk suite à son recrutement sur les motifs ITAMs du BCR. Syk se lie à ses partenaires directs conduisant à l'activation de nombreuses voies de signalisation. (Adapté de Niiro and Clark, 2002)

La fixation de Syk sur les motifs ITAMs entraîne son activation et son interaction avec différents partenaires permettant ainsi l'activation de diverses cascades de signalisation qui aboutissent à la régulation de la prolifération, la survie ou encore la différenciation cellulaire. Essentielle au développement des lymphocytes B, l'implication de Syk dans la signalisation du BCR a été particulièrement étudiée. En effet, les souris déficientes en Syk présentent un défaut de lymphopoïèse B avec un blocage au stade pro-B, démontrant la contribution de Syk à la transition des cellules pro-B en pré-B et sa participation à la signalisation du pré-BCR (Turner et al., 1995). Plus tardivement dans le développement, les cellules B acquièrent et présentent à leur surface des immunoglobulines transmembranaires de type IgM ou IgG qui sont associées à un hétérodimère composé des protéines CD79a (Ig α) et CD79b (Ig β) ; l'ensemble formant

le BCR. Suite à la fixation d'un antigène, les motifs ITAMs des CD79a et CD79b sont phosphorylés sur des résidus tyrosine par Lyn (Src kinase). Ces ppITAM permettent le recrutement de Syk *via* ses domaines SH2 et sa phosphorylation. Syk activée recrute alors à la membrane et phosphoryle la protéine adaptatrice BLNK qui permet la formation d'un signalosome ; ce dernier étant constitué de plusieurs protéines dont l'adaptateur Vav1, les kinases Btk (Bruton Tyrosine kinase) et PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) ainsi que la lipase PLC γ 2 (Phospholipase C gamma 2) (Dal Porto et al., 2004).

L'activation de la lipase PLC γ 2 génère deux messagers secondaires dont le DAG (1,2-diacylglycérol) qui active les protéines kinases C (PKC) et l'IP $_3$ (Inositol 1,4,5-triPhosphate) responsable de la libération intracellulaire de calcium à partir du réticulum endoplasmique. Ces derniers activent la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein) dont JNK (c-Jun N terminal Kinase), ERK (Extracellular Regulated Kinase) et P38. La voie aboutit à l'activation de facteurs de transcription tels que NF κ B (Nuclear Factor kappa B) ou NFAT (Nuclear Factor of Activated T cell) qui régulent la survie des lymphocytes. La PI3K activée elle aussi par le BCR, et par son co-récepteur le CD19, génère à son tour du PIP $_3$ à partir de PIP $_2$ et active les PLC γ , Akt et Vav1. La voie PI3K/Akt régule la prolifération et la survie des lymphocytes B par l'intermédiaire du maintien de l'activation des facteurs de transcription comme NFAT. La phosphorylation et l'activation de Vav1 contrôle la réorganisation du cytosquelette d'actine *via* l'activation des petites GTPases (guanosine triphosphatases) de la famille Rho. Syk, par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice Grb2, active Ras et entraîne la phosphorylation et l'activation des MAPKs décrites précédemment. En dehors de ce rôle effecteur positif de la signalisation Syk possède également un rôle central dans la régulation négative de la signalisation du BCR. D'une part, la déphosphorylation de Syk par la phosphatase SHP1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1) déstabilise le signalosome et neutralise la signalisation du BCR. D'autre part, l'ubiquitination de Syk par l'ubiquitine ligase Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma) induit la dégradation de Syk favorisant ainsi l'atténuation de la signalisation du BCR.

En résumé, la voie du BCR et de ses différents effecteurs illustrés dans la figure 4 contribue à réguler finement plusieurs processus cellulaires dont la survie, la prolifération, la migration et la maturation/différenciation des lymphocytes B (Niro and Clark, 2002; Pierce and Liu, 2010).

5. 2. La voie des intégrines et le contrôle de l'adhérence cellulaire

Dans certaines cellules comme les neutrophiles, les monocytes et les plaquettes, Syk peut également s'associer de manière directe ou par l'intermédiaire d'un adaptateur à des récepteurs ne possédant pas de motif ITAM, comme les intégrines. Ces dernières représentent une famille de récepteurs transmembranaires qui participent à la régulation de l'adhérence et la migration cellulaire (Jakus et al., 2007).

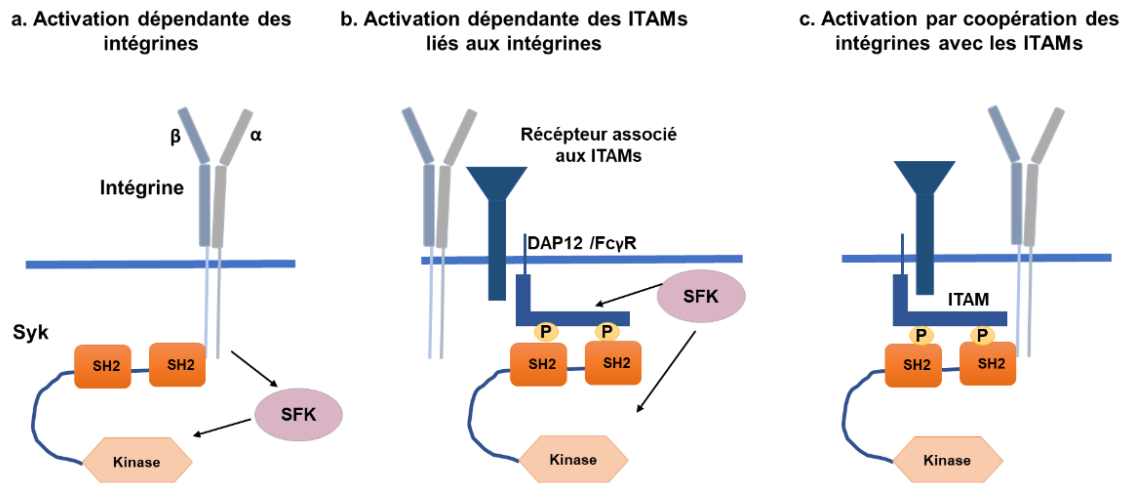


Figure 10: Activation de Syk en aval des intégrines. a. Dans le modèle indépendant des ITAMs, l'interaction directe de Syk non phosphorylée avec la chaîne β des intégrines conduit à son activation. b. Dans le modèle impliquant les ITAMs, l'activation des intégrines induit la phosphorylation des ITAMs des molécules adaptatrices (DAP12 / Fc γ R) et le recrutement de Syk. c. Dans la combinaison des deux modèles, Syk lie à la fois les intégrines et les ITAMs phosphorylés des molécules adaptatrices. Adapté de (Mocsai et al., 2010)

Par exemple, l'intégrine α IIB β 3 présente sur les plaquettes recrute et active Syk. Sa fixation s'effectue sur la queue cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines. Cette liaison dépend d'une autre partie du domaine SH2 que celle engagée dans la reconnaissance des motifs ITAM mais nécessite le domaine SH2 N- term et l'interdomaine A. Ainsi Syk participe à et régule l'adhésion des plaquettes à la fibronectine (Woodside et al., 2001; Woodside et al., 2002). Par ailleurs, des protéines peuvent servir d'intermédiaires entre Syk et les intégrines. En effet, la protéine adaptatrice DAP12 (Death associated protein 12), ou la chaîne γ des FcR, qui contiennent toutes deux des motifs ITAMs, ont la capacité de ponter Syk aux intégrines dans les neutrophiles et les macrophages. Les deux mécanismes d'activation de Syk pourraient toutefois coexister dans les différents types cellulaires (Mocsai et al., 2006; Mocsai et al., 2010) (Figure 10).

5. 3. Les autres voies de signalisation impliquant Syk

Syk joue également un rôle dans la signalisation du récepteur PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) impliqué dans le roulement des leucocytes sur l'endothélium activé. L'activation du récepteur PSGL-1 permet le recrutement des protéines de la famille ERM (Ezrine, Radixine et Moésine) qui constituent des intermédiaires entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine. En effet, la fixation des protéines ERM entraîne la phosphorylation de leurs motifs ITAM favorisant ainsi la liaison de Syk. Les protéines ERM servent donc d'adaptateurs pour permettre l'activation de Syk dans les leucocytes *via* le PSGL-1 (Urzainqui et al., 2002).

La chimiokine CXCL12/SDF1 active également Syk dans les cellules B où les mécanismes responsables de cette activation n'ont pas encore été totalement éclaircis. La stimulation du récepteur CXCR4 par CXCL12 régule la polarité et la migration des cellules hématopoïétiques en activant la PI3K et la kinase BTK qui est elle-même un effecteur phosphorylé de Syk (Matsusaka et al., 2005).

Les récepteurs aux lectines de type C (CLRs) constituent une famille de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des oligosaccharides des pathogènes. Ce sont des récepteurs dotés d'hém ITAM qui ne possèdent qu'un seul motif tyrosine reconnu par Syk. Les Clec-7A (Dectin-1), Clec-6A et Clec-4E, qui sont exprimés par les cellules dendritiques, permettent l'activation de Syk et modulent la réponse innée du système immunitaire par l'activation de voies de signalisation telles que NFAT, MAPK et PI3K (Mócsai et al., 2010). Dans les plaquettes, les récepteurs Clec-2 forment un dimère qui induit le recrutement de Syk grâce à leurs deux domaines SH2 menant ainsi à l'activation plaquettaire (Fuller et al., 2007; Hughes et al., 2010). L'interaction de Syk avec ces récepteurs ou co-récepteurs induit des changements structuraux importants de la kinase favorisant le passage d'une conformation basale inactive à une conformation active (Grädler et al., 2013; Mansueto et al., 2019; Mócsai et al., 2010).

6. Régulation de l'activation et de l'activité de Syk par phosphorylation

6.1. Activation

Deux modèles d'activation de Syk ont été proposés. Le premier modèle nommé « OR-gate » propose une activation de Syk suite à sa phosphorylation ou sa liaison via son domaine SH2 au motif ITAM doublement phosphorylé. Tandis que le deuxième modèle repose sur une activation suite à son interaction avec un motif ITAM doublement phosphorylé par une kinase de la famille des Src qui permet le recrutement de Syk au niveau du récepteur. Une étude basée sur la spectrométrie de masse a mis en évidence 32 sites de phosphorylation dans la séquence de Syk dont 15 résidus tyrosine, 6 thréonines et 11 sérines dans des cellules B après que le BCR ait été engagé (Bohnenberger et al., 2011).

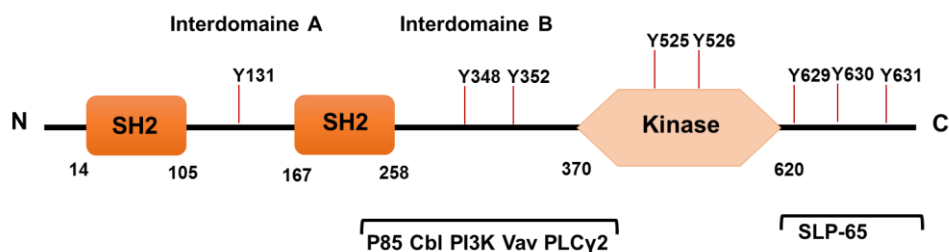


Figure 11: Les principaux sites de phosphorylation de Syk et les protéines capables de lier les résidus phosphorylés.

Tableau 2 : Les principaux sites de phosphorylation de Syk, les kinases impliquées et l'impact fonctionnel de ces modifications sur Syk elle-même et sur la voie de signalisation.

Résidus phosphorylés	Kinases responsables	Fonctions	Références
Tyr 131	Syk, Lyn	Déstabilisation de l'interaction entre IDA et IDB dans le maintien de la conformation fermée/autoinhibée Diminue l'affinité avec les ITAMs des immunorécepteurs et favorise l'activité catalytique de Syk	(de Castro, 2011; Keshvara et al., 1997; Travers et al., 2019; Zhang et al., 2008)

Ser 291	PKC	Phosphorylation en aval du BCR augmente l'activité transcriptionnelle de NFAT ou de Elk1	(Paris et al., 2010)
Tyr 296	Syk	Distingue Syk ou Syk L de la forme Syk-B au niveau de la signalisation cellulaire.	(Furlong et al., 1997; Zhou et al., 2006)
Tyr323	Syk, Src (Lyn)	Induit l'interaction avec Cbl ou PI3K.	(Sada et al., 2000) (Furlong et al., 1997) (Hong et al., 2002; Keshvara et al., 1998; Moon et al., 2005)
Tyr348/Tyr 352	Syk, Src	- Impliqués dans l'activation de Syk - Régulent positivement la signalisation du BCR et les interactions avec les partenaires (PLC γ , Vav1, Vav2, Src, PI3K, Grb2).	(Deckert et al., 1996; Furlong et al., 1997; Grädler et al., 2013)
Tyr 525/526	Syk	Potentialise l'activation de Syk et la phosphorylation de ses substrats.	(Furlong et al., 1997; Grädler et al., 2013; Zhang et al., 1998)
Tyr 629-631	Syk	L'autophosphorylation déstabilise la conformation auto-inhibée. La pY630 est un site d'ancrage de BLNK pour maintenir Syk activée.	(de Castro et al., 2012; de Castro et al., 2010; Kulathu et al., 2009)

Certaines de ces phosphorylations sont situées sur des résidus de l'interdomaine B, soulignant le rôle clé de ce domaine dans le contrôle des fonctions de Syk (Geahlen, 2009; Latour et al., 1998). Les plus décrites dans la littérature sont la phosphorylation des résidus Y131 de l'IDA, Y323, Y348 et Y352 de l'IDB, ainsi que Y525/Y526 du domaine catalytique et enfin les Y629-631 au niveau de la queue C-term (Figure 11 ; tableau 2). Lors de l'activation de Syk, la phosphorylation de ces résidus tyrosine joue un rôle important dans la régulation de son activation et de son activité (Furlong et al., 1997; Keshvara et al., 1998).

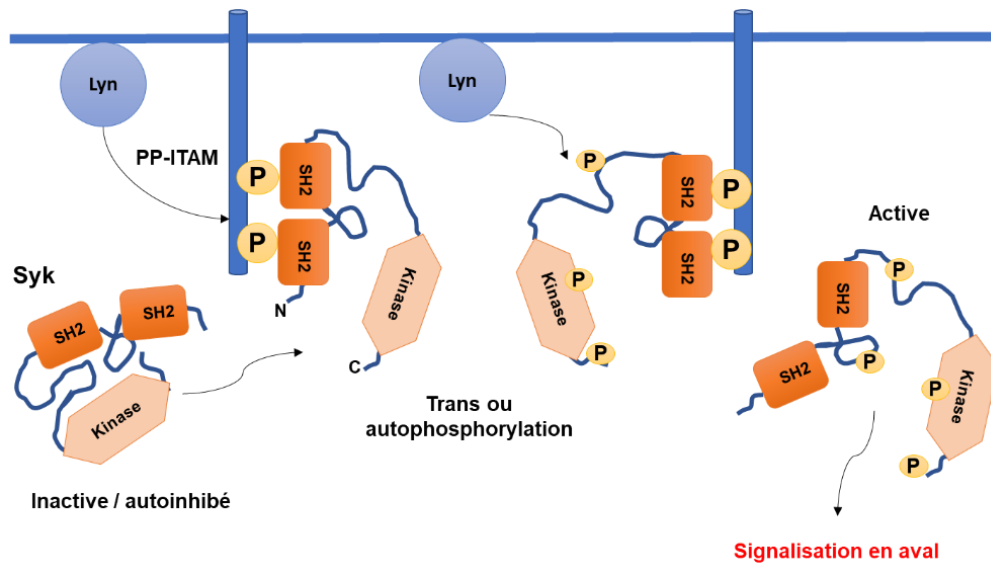


Figure 12: Activation de Syk via les motifs ITAMs. Suite à la stimulation d'un récepteur immun, Lyn phosphoryle les motifs ITAMs qui servent d'ancrage à la kinase Syk. Ce recrutement induit des changements de conformation qui libèrent Syk de sa structure auto-inhibée et favorisent son activation. Syk est ensuite phosphorylé par trans ou autophosphorylation sur ses résidus tyrosines dont ceux permettant sa libération du récepteur. Adapté de (de Castro et al., 2011)

A l'état inactif ou basal, Syk est non phosphorylée et adopte une conformation compacte auto-inhibée comme le montre la structure cristallographique. Cette conformation est assurée, notamment, par des liaisons (hydrogènes ou autres) impliquant les chaînes latérales d'acides aminés aromatiques présents dans les inter-domaines et l'extrémité C-term (Grädler et al., 2013). Lors de la stimulation des récepteurs membranaires par leurs ligands respectifs, Lyn est activée et phosphoryle les ITAMs. Cette phosphorylation entraîne le recrutement de Syk, qui à son tour, est phosphorylé par Lyn ou s'autophosphoryle sur certains de ses résidus tyrosine, dont ceux de la boucle d'activation (Y525/Y526). L'ensemble de ces modifications entraîne des changements conformationnels passant par une exposition du domaine kinase qui conduit à une activation complète de la tyrosine kinase.

L'interaction de Syk avec les motifs ITAMs est régulée par la phosphorylation de la Y131 située dans l'IDA. La substitution de cette tyrosine par des résidus glutamate ou phénylalanine montre que l'autophosphorylation de la Y131 libère Syk des motifs ITAMs pour phosphoryler d'autres substrats (de Castro, 2011; Keshvara et al., 1997; Travers et al., 2019; Zhang et al., 2008) (Figure 12).

L'IDB contient aussi des résidus tyrosine régulateurs de l'activation de Syk, dont les Y348 et Y352. Ces résidus, phosphorylables par Syk ou par les kinases de la famille Src (SFKs), participent à la transition entre la conformation auto-inhibée et la conformation active de Syk (Brdicka et al., 2005). En effet, la mutation de ces résidus tyrosine en phénylalanine maintient Syk dans une conformation auto-inhibée (Grädler et al., 2013). La phosphorylation de ses résidus est également impliquée dans l'interaction de Syk avec des partenaires clés. Le facteur d'échange nucléotidique Vav1 est recruté suite à la phosphorylation sur la Y348, alors que les PLC γ 1 et 2 *via* leur domaine SH2 se lient aux deux résidus (Y348 et 352) phosphorylés (Deckert et al., 1998; Law et al., 1996; Simon et al., 2005b).

Le domaine kinase contient également des sites d'autophosphorylation avec les résidus tyrosine Y525 et Y526 qui sont localisés dans la boucle d'activation. La phosphorylation de ces deux résidus tyrosine est considérée comme un marqueur final de l'activation de Syk. En effet, la mutation de l'une ou des deux tyrosines bloque la phosphorylation des substrats de Syk et abolit la signalisation dans les cellules B (Zhang et al., 2000).

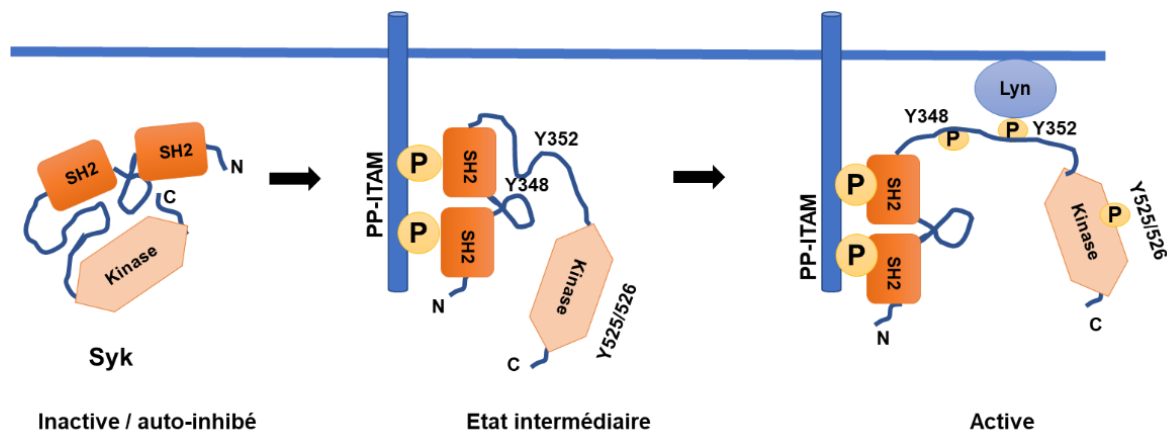


Figure 13: Le modèle d'activation de Syk par phosphorylation des ITAMs, de l'interdomaine et de son auto-phosphorylation. Adapté de (Mansueto et al., 2019).

Plus récemment, un nouveau modèle a été proposé sur les mécanismes d'activation de Syk et sur la chronologie de phosphorylation des résidus tyrosine impliqués dans son activation. En effet, les études biochimiques précédemment menées *in vitro* utilisent des constructions de Syk qui ne peuvent être totalement comparées à la protéine endogène (Tsang et al., 2008). Bien

que plus pertinentes et plus représentatives des conditions physiologiques, les études *in cellulo* fournissent, quant à elles, des données parfois complexes et souvent difficiles à disséquer en termes d'étapes dans le processus d'activation de Syk. Ce nouveau modèle est basé sur l'utilisation d'une forme recombinante de Syk qui est générée à partir d'un lot unique de cellules. Ces dernières expriment une construction de Syk qui est modifiable et capable de donner naissance à des formes comparables de Syk inactive ou active. Cette stratégie a permis d'enrichir la compréhension du mécanisme d'activation de Syk en se plaçant dans des conditions comparables aux conditions physiologiques. Selon cette étude, l'ancrage sur les motifs ITAM doublement phosphorylés par les deux domaines SH2 rend le résidu tyrosine 352 accessible à la phosphorylation par Lyn. Cette première modification facilite la phosphorylation ultérieure du résidu tyrosine 348 et l'autophosphorylation des tyrosines 525/526. L'ensemble de ces phosphorylations aboutit à l'activation complète de Syk (Mansueto et al., 2019) (Figure 13). Syk adopterait donc un mécanisme d'activation graduel qui impliquerait un état intermédiaire où Syk est liée aux motifs ITAMs et qui serait suivi d'une activation complète grâce aux Src et à Syk elle-même.

6.2. Mécanisme d'inactivation de Syk

Comme pour son activation, le retour à l'état basal autoinhibé de Syk est également contrôlé par un jeu de diverses phosphorylations. En effet, la séquence de Syk contient plusieurs résidus sérine et thréonine qui peuvent être phosphorylés, dont la sérine en position 297 située dans l'IDB. La phosphorylation de la S297 est attribuée à la protéine kinase C (PKC) qui est

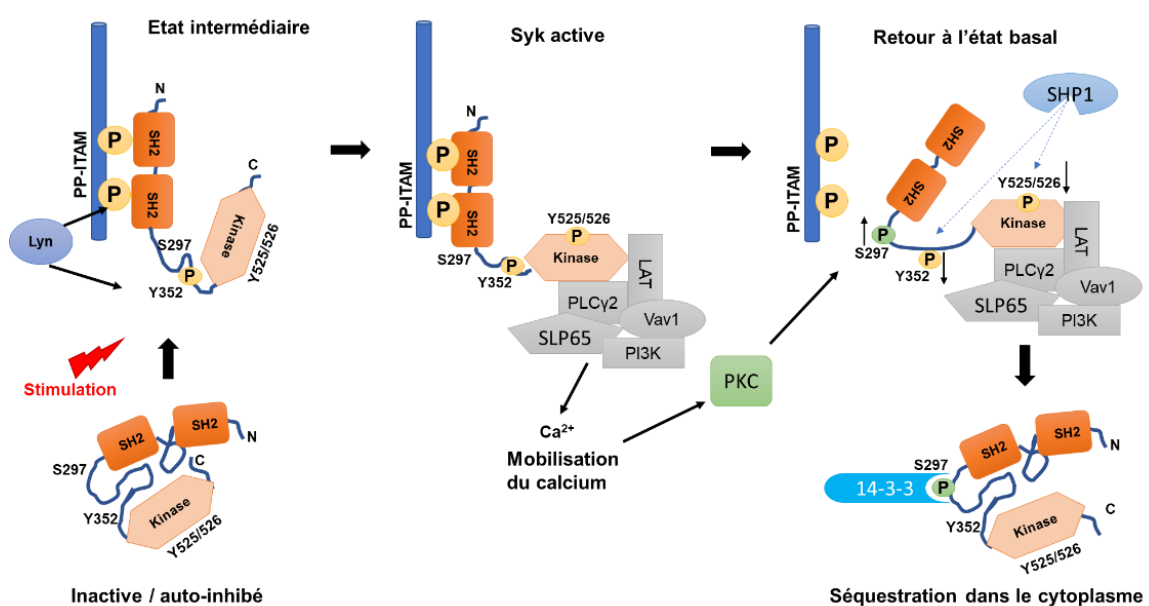


Figure 14: Le rétrocontrôle de Syk par la PKC. Adapté de (Makhoul et al., 2019)

activée en réponse à la stimulation de glycoprotéines membranaires qui assurent le rétrocontrôle de l'activité de Syk au cours de l'activation plaquettaire (Makhoul et al., 2019). En effet, la phosphorylation de la S297 permet le recrutement de la protéine 14-3-3 qui séquestre Syk dans le cytoplasme et diminue ainsi la signalisation du BCR (Mohammad et al., 2016) (Figure 14).

Par ailleurs, le résidu tyrosine 323, situé également dans l'IDB, est un résidu clé dans le contrôle de l'activité de Syk. Une fois phosphorylé, ce résidu est reconnu par le domaine SH2 de l'ubiquitine ligase Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) qui induit la dégradation de Syk (Lupher et al., 1998; Yankee et al., 1999).

Si l'activité de Syk peut être régulée par la phosphorylation de certains de ses résidus, elle l'est aussi par l'action de phosphatases avec notamment SHP1. La phosphorylation de SHP1 par Lyn permet son recrutement au niveau du BCR où la phosphatase peut déphosphoryler et inactiver Syk (Veillette et al., 2002).

Malgré une littérature abondante, l'impact structurel/fonctionnel de toutes les phosphorylations de Syk de manière endogène n'a pas encore été déterminé, probablement à cause du nombre limité de phospho-anticorps spécifiquement dirigés contre ces résidus phosphorylés et disponibles actuellement sur le marché. Ces études permettraient de mieux comprendre comment Syk est préférentiellement impliquée dans une voie de signalisation par rapport à une autre dans un type cellulaire et son rôle dans les cellules cancéreuses.

7. Dualité fonctionnelle de Syk dans les cancers

Si Syk est un acteur essentiel de la machinerie de signalisation en aval des récepteurs des cellules hématopoïétiques, un nombre croissant de publications montre que cette protéine l'est également dans des cellules non-hématopoïétiques.

De plus, des altérations de son expression et/ou de son activation démontrent son implication dans le développement de cancers, qu'ils soient d'origine hématopoïétique ou non. Pour autant, sa fonction dans ces pathologies est duelle car elle peut jouer un rôle pro- ou anti-tumoral. Si la fonction pro-tumorale a longtemps été principalement décrite dans les leucémies et les lymphomes, la fonction anti-tumorale est majoritairement attribuée aux cancers d'origine épithéliale. Notamment, une activation constitutive de Syk dans certaines hémopathies est à l'origine d'une résistance à l'apoptose des cellules tumorales alors qu'une diminution de son expression dans certains cancers d'origine épithéliale est corrélée à la progression tumorale. Syk peut donc être un promoteur ou un suppresseur de tumeur principalement en fonction du type cellulaire.

7.1. Promoteur de tumeur

Par son rôle majeur dans la voie de signalisation du BCR et dans la survie cellulaire, la fonction de Syk, en tant que promoteur de tumeur, est majoritairement détaillée dans les pathologies ciblant les cellules B. Dans la majorité des hémopathies (décrites dans le tableau 3), une activation constitutive de Syk est un des marqueurs fondamentaux. Par exemple, dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), une surexpression de Syk, ainsi que son activation basale plus élevée, sont détectées dans les cellules B pathologiques *versus* les lymphocytes B normaux. L'inhibition de l'expression de Syk ou bien un traitement par des inhibiteurs pharmacologiques induisent une entrée en apoptose des cellules B leucémiques (Buchner et al., 2009; Chen et al., 2008b; Gobessi et al., 2009). Ces effets ont été également observés dans d'autres hémopathies décrites dans le tableau 2. En réponse à une stimulation antigénique, la survie des cellules B de LLC dépend d'un seuil imposé par les niveaux d'expression du BCR membranaire, de Syk et/ou de Zap70. Elle est également liée aux taux de phosphorylation globale de Syk dans les cellules leucémiques de patients répondant en termes de survie cellulaire à la stimulation du BCR (Le Roy et al., 2012). Dans ce contexte, la phosphorylation constitutive de Syk sur le résidu tyrosine 352 par les SFKs (Lyn, Lck) conduit à son activation et à une régulation positive de la survie des cellules B leucémiques. De plus, la phosphorylation de résidus tyrosine 525 et 526 est également impliquée dans cette activation constitutive menant à l'augmentation de la phosphorylation des effecteurs qui induisent la prolifération des cellules B de LLC (Buchner et al., 2009; Carsetti et al., 2009; Gobessi et al., 2009).

Le rôle promoteur de tumeur de Syk n'est tout de même pas restreint aux cellules hématopoïétiques. Sa surexpression a été également observée dans les cancers du poumon (Singh et al., 2009), de l'ovaire (Lowe et al., 2004), du cou et de la tête (Black et al., 2020; Luangdilok et al., 2007) ainsi que dans les rétinoblastomes (Zhang et al., 2012). La déplétion de Syk par une approche d'ARN interférence dans des cellules de carcinomes pulmonaires diminue la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose (Udyavar et al., 2013). L'expression de Syk dans ces pathologies cancéreuses est donc associée à un mauvais pronostic de survie des patients.

La survie des cellules cancéreuses dans une grande proportion des adénocarcinomes pulmonaires et pancréatiques dépend des mutations oncogéniques de K-Ras. La mutation du gène *Kras* modifie le site de liaison du GTP sur la protéine p21-Ras. De ce fait, l'activité GTPasique de p21-Ras mutée est réduite, ainsi que sa capacité à interagir avec les *GTPases activating proteins*. La conséquence fonctionnelle de cette mutation est une sur-activation de

p21-Ras, en permanence liée au GTP. Les signaux mitogènes, de migration, d'invasion et d'angiogenèse sont donc activés constitutivement et ne requièrent pas d'activation préalable déclenchée par la fixation d'un facteur de croissance ou pro-angiogénique à leur récepteur.

Des analyses d'expressions géniques ont montré que Syk est le gène le plus communément exprimé dans les cellules dépendantes de K-Ras. Dans ces cellules, la déplétion de Syk induit l'apoptose *via* l'activation de la caspase 3. Ceci laisse suggérer que Syk protège les cellules de l'apoptose induite par K-Ras (Singh et al., 2009).

Tableau 3: Syk un promoteur de tumeurs (Krisenko et Geahlen, 2015)

Type du Cancer	Observations	Références
Leucémie lymphoïde chronique (LLC)	Surexpression et activation constitutive de Syk. Inhibition de Syk induit l'apoptose.	(Buchner et al., 2009) (Chen et al., 2008a) (Gobessi et al., 2009)
Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL)	Activation constitutive de Syk. Amplification du gène Syk. Inhibition de SYK induit l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire.	(Chen et al., 2008b; Chen et al., 2013) (Cheng et al., 2011)
Lymphome folliculaire (LF)	Surexpression de Syk. Inhibition de Syk diminue l'activité mTOR. Inhibition de l'invasion et de l'angiogénèse	(Leseux et al., 2006) (Fruchon et al., 2012)
Lymphome du manteau (LCM)	Surexpression de SYK (faible amplification du gène). Inhibition de Syk induit l'apoptose.	(Rinaldi et al., 2006)
Lymphome de la zone marginale (LZM)	Surexpression de SYK.	(Ruiz-Ballesteros et al., 2005)
Leucémie aigüe lymphoblastique B (LAL-B)	Activation constitutive de SYK. Inhibition de Syk induit l'arrêt de la prolifération et l'apoptose.	(Perova et al., 2014) (Uckun et al., 2013)
Lymphome des cellules T périphériques (PTCL)	Surexpression et activation constitutive de SYK. Protéine fusion ITK-SYK.	(Feldman et al., 2008) (Pechloff et al., 2010)
Lymphome B-Epstein-Barr + (post-transplantation)	Activation de SYK par la protéine virale LMP2A. Inhibition de SYK induit l'apoptose.	(Hatton et al., 2013)
Leucémie aigüe myéloïde (LAM)	Activation de SYK par les intégrines. Inhibition de SYK diminue la prolifération cellulaire et induit la différenciation.	(Hahn et al., 2009; Miller et al., 2013) (Cremer et al., 2020)

Carcinome nasopharyngien	Activation de Syk par LMP2A	(Fotheringham et al., 2012)
Cancer du sein HER2 positif	Activation de Syk par la protéine oncogénique C35	(Katz et al., 2010)
Cancer du pancréas et du poumon	Dépendance de l'expression de K-RAS. Inhibition de Syk induit l'apoptose.	(Singh et al., 2009)
Rétinoblastome	Expression unique de Syk dans les cellules tumorales. Inhibition de Syk induit l'apoptose.	(Zhang et al., 2012)
Cancer de poumon à petites cellules (SCLC)	Surexpression de Syk dans les tumeurs. Inhibition de Syk induit l'apoptose.	(Udyavar et al., 2013)
Carcinome squameux de la tête et du cou (SCCHN)	Syk stimule la motilité et l'invasion cellulaires. Expression de Syk corrélée avec le papillomavirus	(Luangdilok et al., 2007) (Black et al., 2020)
Glioblastome	Syk stimule la prolifération et la migration cellulaires. Inhibition de Syk réduit la croissance tumorale.	(Moncayo et al., 2018) (Sun et al., 2019)
Sarcome d'Ewing	Activation constitutive de Syk. Inhibition de Syk induit l'apoptose.	(Sun et al., 2017)
Cancer de la prostate	Syk favorise la migration et l'invasion cellulaires. Inhibition de Syk diminue l'apparition de métastases.	(Ghotra et al., 2015)

7.2. Suppresseur de tumeur

Syk a été initialement décrite comme un suppresseur de tumeur dans les carcinomes mammaires invasifs. L'analyse de ces cellules tumorales montre que son expression est plus faible que dans des cellules normales avec une expression de Syk inversement corrélée à l'invasion des cellules du cancer du sein. Son expression ectopique réduit la croissance tumorale et la formation de métastase (Coopman et al., 2000). La perte de Syk est progressive au cours du développement tumoral, allant d'un faible niveau d'expression dans le carcinome canalaire *in situ* à une complète disparition dans le cancer du sein le plus invasif (Blancato et al., 2014; Moroni et al., 2004). Des études phospho-protéomiques montrent que Syk agit directement sur des effecteurs des voies de signalisation qui régulent l'adhérence cellulaire et la motilité des cellules du cancer du sein. En effet, elle contrôle l'axe de signalisation Syk-Src-Cortactine qui est impliqué dans la formation des jonctions cellulaires suite à la phosphorylation directe de la Cortactine sur son résidu tyrosine 334 par Src. Par ailleurs, Syk phosphoryle l'Ezrine sur le résidu tyrosine 424 à la membrane plasmiques des cellules cancéreuses et régule ainsi leur

motilité (Naldi et al., 2017). En revanche, dans les lymphocytes B, cette phosphorylation s'effectue sur le résidu tyrosine 353 de l'Ezrine et active les voies de signalisation JNK ou PI3K /AKT au cours de l'activation des lymphocytes B (Parameswaran et al., 2013). Ainsi, la phosphorylation de certains effecteurs par Syk pourrait induire des cascades de signalisation différentes en fonction du type cellulaire dans lequel elle est exprimée. Ces régulations moléculaires pourraient expliquer les fonctions parfois opposées de Syk dans les cancers.

L'expression de Syk est non seulement inversement corrélée à la gravité du cancer du sein mais également à celles d'autres tumeurs dérivées de cellules épithéliales, telles que les cancers de la vessie (Kunze et al., 2006), colorectal (Yang et al., 2013), gastrique (Nakashima et al., 2006), de l'ovaire (Lowe et al., 2004), nasopharyngien (Jin et al., 2012), pancréatique (Layton et al., 2009), hépatique (Yuan et al., 2006) et le mélanome (Bailet et al., 2009) (Tableau 4). De manière étonnante, Syk pourrait aussi jouer un rôle anti-tumoral dans le système hématopoïétique. A l'opposé de la LLC, l'extinction de Syk favorise le développement de la leucémie aigüe lymphoblastique des cellules pro-B. Ainsi la réduction de l'expression de Syk provoque un arrêt de la maturation des cellules B au stade pro-B (Goodman et al., 2001). L'expression de Syk dans ces leucémies est donc corrélée à un meilleur pronostic de survie des patients.

Du point de vue des mécanismes mis en jeu, la diminution des niveaux d'expression de Syk observée dans ces cellules cancéreuses résulte probablement d'une hyperméthylation de son promoteur (Yuan et al., 2001). De plus, la perte de localisation nucléaire de Syk est probablement due à un épissage alternatif conduisant à l'expression de l'isoforme Syk-B, qui est essentiellement localisée dans le cytoplasme. L'expression différentielle des deux isoformes de Syk dans les cancers rajoute un degré de complexité aux études menées sur Syk.

Tableau 4: Syk un supprimeur de tumeurs (Krisenko et Geahlen, 2015)

Type du cancer	Observations	Références
Leucémie aigüe lymphoblastique des cellules pro-B (Pro-LAL-B)	L'extinction de Syk aggrave la leucémie.	(Goodman et al., 2001)
Cancer du sein	Diminution de l'expression de Syk est corrélée à l'invasion et la progression tumorales. Inhibition de l'expression due à une méthylation du promoteur et perte allélique.	(Blancato et al., 2014; Coopman et al., 2000) (Moroni et al., 2004) (Sung et al., 2009; Toyama et al., 2003)

	La ré-expression de Syk inhibe la migration et les métastases. L'extinction de Syk induit l'EMT.	
Cancer du pancréas	Perte de Syk dans les cellules tumorales faiblement différenciées. L'extinction de Syk induit l'EMT.	(Layton et al., 2009)
Cancer de la vessie	Expression de Syk diminuée, extinction épigénétique.	(Kunze et al., 2006)
Cancer colorectal	Extinction épigénétique de Syk. La ré-expression de Syk réduit la migration et l'invasion cellulaires.	(Yang et al., 2013) (Dasgupta et al., 2017)
Mélanome	Expression de Syk diminuée, extinction épigénétique. La ré-expression de Syk réduit la migration et l'invasion cellulaires. La ré-expression dans les lignées induit la sénescence.	(Bailet et al., 2009) (Hoeller et al., 2005) (Muthusamy et al., 2006)
Cancer gastrique	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique. Changement dans la localisation nucléaire.	(Nakashima et al., 2006) (Wang et al., 2004)
Cancer nasopharyngien	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique.	(Jin et al., 2012)
Carcinome hépatocellulaire (HCC)	Extinction épigénétique de Syk. La ré-expression de Syk réduit la migration et l'invasion cellulaires. L'interaction avec et la phosphorylation par CHK1 induit la dégradation de Syk. Ré-expression de Syk réduit la migration et l'invasion cellulaires. Expression de Syk(S) favorise l'apparition de métastases.	(Yuan et al., 2006) (Hong et al., 2012; Hong et al., 2014)
Cancer de l'ovaire	Syk (L) favorise la survie cellulaire alors que l'expression de Syk (S) induit l'apoptose. Syk régule la motilité et l'invasion des cellules via la phosphorylation de la cortactine. Syk participe à la progression tumorale.	(Lowe et al., 2004) (Yu et al., 2019; Zhang et al., 2019)

8. Le rôle de Syk au niveau des jonctions intercellulaires et de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)

Les voies de signalisation par lesquelles Syk exerce ses effets anti-prolifératifs et anti-invasifs dans les cellules épithéliales restent à ce jour largement inconnues. En effet, il semble qu'elles impliquent des effecteurs différents de ceux décrits dans les cellules hématopoïétiques. Une approche de phospho-protéomique sur des lignées cellulaires mammaires a identifié des substrats potentiels de Syk impliqués dans l'adhérence cellule-cellule (E-Cadhérine, α -Caténine) et la polarité épithéliale (occludine, ZO3, claudin3). De plus, Syk, qui est localisée au niveau des contacts intercellulaires, phosphoryle la E-cadhérine et cette phosphorylation semble être importante pour la localisation de la p120-caténine aux jonctions adhérentes (Larive et al., 2009; Nelson et al., 2013).

Syk s'associe également à la protéine d'adhérence cellulaire, la Cortactine, et catalyse sa phosphorylation. L'expression de Syk dans les carcinomes mammaires inhibe la motilité cellulaire en favorisant la formation d'amas cellulaires par l'amélioration des contacts cellule-cellule suite à la redistribution des molécules d'adhésions (Zhang et al., 2009a). Par ailleurs, la phosphorylation du complexe E-Cadhérine/ Caténine (α , β) par Syk stabilise le complexe au niveau des jonctions cellulaires et favorise l'intégrité épithéliale *via* l'inhibition de la migration et l'invasion des cellules de carcinome mammaire. Ceci suggère que Syk régule négativement la TEM dans les carcinomes mammaires. De même, le KO conditionnel de Syk au niveau des glandes mammaires de souris perturbe la localisation de la E-cadhérine au niveau des jonctions cellulaires (Kassouf et al., 2019).

L'ensemble de ces résultats illustre une implication importante de l'interaction de Syk avec le couple E-Cadhérine/ β -Caténine dans le maintien de l'intégrité épithéliale des cellules en empêchant la TEM et la progression tumorale dans les carcinomes mammaires.

III. β -caténine : une protéine multifonctionnelle

1. Généralités

La voie Wnt/ β -caténine est une des voies de signalisation très conservées dans le règne animal. La β -caténine est un acteur fondamental de cette voie qui joue des rôles cruciaux au cours du développement embryonnaire et dans le contrôle de la prolifération et de l'homéostasie tissulaire. Le gène *Ctnnb1* codant la β -caténine est situé au niveau du locus 3p22.1 du chromosome 3 chez l'homme. La β -caténine, dont l'expression est ubiquitaire, a été découverte pour la première fois chez la Drosophile sous le nom Armadillo au cours d'une recherche de protéines impliquées dans le développement embryonnaire. Ultérieurement, une seconde étude a identifié trois protéines qui ont la capacité de s'associer aux cadhérines et qui participent à la formation des jonctions intercellulaires (Ozawa et al., 1989). Ces trois protéines constituent la famille des caténines (α , β et γ) et forment un point d'ancrage des cadhérines au cytosquelette d'actine dans plusieurs types cellulaires. La β -caténine chez l'homme qui montre 70% d'homologie avec la protéine Armadillo de Drosophile a une séquence très conservée entre les espèces. Les domaines structuraux de la β -caténine lui confèrent une double fonction : elle est à la fois impliquée dans la formation des jonctions d'adhérences entre les cellules et dans la régulation de la signalisation cellulaire et l'expression des gènes.

L'importance cruciale de l'expression de la β -caténine au cours du développement embryonnaire a clairement été démontrée dans les modèles murins. En effet, son inactivation entraîne une létalité embryonnaire au septième jour post-coïtum. Les embryons de souris KO pour la β -caténine présentent un défaut de formation de l'axe antéro-postérieur au jour embryonnaire 5,5 (Behrens, 2000; Haegel et al., 1995)

2. Structure

La β -caténine (781aa ~ 88KDa) possède trois domaines clés qui régulent aussi bien sa localisation que ses fonctions. Le domaine central (résidus 138 à 664) est constitué de la

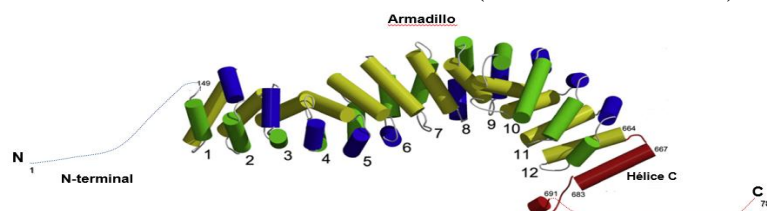


Figure 15: Structure de la β -caténine. Le domaine central est formé de 12 répétitions Armadillo. Chacune représente la liaison de trois hélices organisées en triangle. Le domaine Armadillo est limité par un domaine N-terminal et un domaine C-terminal comprenant une hélice C (Adapté de Xing Y et al, 2008).

répétition de 12 domaines Armadillo (ARM). Chaque domaine ARM est formé de trois hélices arrangées en triangle, assurant des interactions protéines-protéines. Cette région centrale est limitée par un domaine N-terminal (NTD : résidus 1 à 137) qui participe à réguler aussi bien la dégradation que la stabilisation de la protéine et un domaine C-terminal (CTD : résidus 665 à 781) impliqué dans la transactivation requise pour l'activation de l'expression des gènes cibles (Figure 15).

Dans le domaine CTD proche de la dernière répétition Armadillo se trouve une Hélice C (résidus 667 à 683) hautement conservée entre les membres de la famille caténine. Elle est impliquée dans les interactions avec certains co-facteurs de transcriptions comme TCF/LEF et Foxo (Voir paragraphe voie de signalisation Wnt) (Xing et al., 2008).

Les domaines NTD et CTD mais surtout le domaine central de la β -caténine forment une plateforme d'interaction avec de nombreux partenaires. Ces interactions sont spécifiques mais peuvent différer suivant les compartiments cellulaires et participent aux fonctions structurales et transcriptionnelles de la β -caténine.

3. La β -caténine et l'adhérence cellulaire

Au niveau de la membrane, la β -caténine est une protéine structurante des jonctions d'adhérences. Ce type de jonction est essentiel à l'organisation d'un tissu ou d'un organe. Les jonctions d'adhérences cellules-cellules sont assurées au niveau de la membrane par la famille des cadhérines. Ces dernières sont des glycoprotéines transmembranaires qui s'engagent dans des interactions homotypiques dépendantes du calcium. Elles forment un homodimère *via* leurs régions extracellulaires et interagissent avec la β -caténine *via* leurs extrémités cytoplasmiques. Cette liaison s'effectue également, indépendamment de l'adhérence, dans des cellules isolées (Stepniak et al., 2009). La β -caténine, quant à elle, interagit avec la E-cadhérine *via* ses domaines Armadillo. Le deuxième membre de la famille des caténines, l' α -caténine, est un autre élément essentiel des jonctions d'adhérences et interagit avec la β -caténine *via* le domaine NTD. Ce complexe tripartite membranaire constitue l'unité structurale des jonctions (Figure 16).



Figure 16: Partenaires de la β -caténine au niveau des jonctions d'adhérences.

La β -caténine protège la E-cadhérine de la dégradation par le protéasome via sa liaison qui masque un motif PEST reconnu normalement par les ubiquitines ligases (Hinck et al., 1994).

Réciproquement, son association avec la E-cadhérine empêche l'action d'un complexe de destruction stabilisant ainsi son taux cytoplasmique/membranaire (Huber et al., 2001).

La liaison avec l' α -caténine stabilise le complexe β -caténine / E-cadhérine au niveau des jonctions et en interagissant également avec l'actine qui module la dynamique de la membrane plasmique (Benjamin et al., 2010).

Cette triple interaction joue un rôle central dans l'organisation structurale et fonctionnelle des contacts cellule-cellule. Ces jonctions cadhérines-caténines sont des complexes moléculaires très dynamiques. La perte d'adhérence cellulaire médiée par le clivage des cadhérines peut favoriser la libération de la β -caténine et active ses autres fonctions. En revanche, la cadhérine peut agir comme un piège à la membrane pour la fraction de la β -caténine libre (Heuberger and Birchmeier, 2010). Plusieurs protéases peuvent cliver le domaine intracellulaire des cadhérines et ainsi affecter l'intégrité des jonctions adhérentes et par voie de conséquence les activités de la β -caténine.

Différentes modifications post-traductionnelles des différents partenaires participent à la stabilité de ces jonctions en jouant sur leurs dégradations et leurs interactions. Certaines de ces modifications, et principalement des phosphorylations, seront présentées dans le paragraphe décrivant les modifications post-traductionnelles.

4. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La β -caténine est l'effecteur principal de cette voie jouant un rôle régulateur de la transcription de différents gènes et les ligands Wnt sont des glycoprotéines secrétées agissant de manière autocrine ou paracrine. Cette voie de signalisation participe au contrôle de nombreuses fonctions cellulaires au cours du développement embryonnaire et adulte (Clevers, 2006).

En absence de stimulation par Wnt, la β -caténine se trouve essentiellement au niveau des jonctions d'adhérences associée aux cadhérines. La fraction cytoplasmique de la β -caténine est essentiellement dégradée par un complexe de destruction/dégradation constitué des protéines suivantes : Axine, Caseine kinase 1 (CK1), Adenomatous polyposis coli protein (APC) et Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3) (Figure 17).

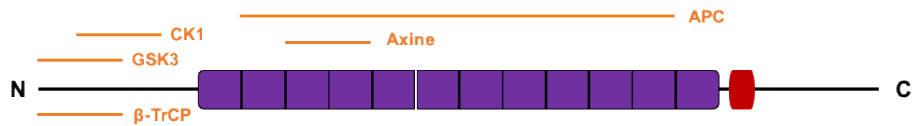


Figure 17: Interaction de la β -caténine avec les protéines du complexe de destruction.

Les kinases CK1 et GSK3 β phosphorylent respectivement la β -caténine sur des résidus serines et thréonines présentes dans l'extrémité N-terminale (Ser33, Ser37, Thr41 et Ser45) (Liu et al., 2002). Ces phosphorylations permettent le recrutement de l'ubiquitine ligase β -TrCP (β -transducin repeats-containing protein) entraînant la dégradation de la β -caténine par le protéasome (Wu et al., 2003). Dans ces conditions, l'expression des gènes régulée par la β -caténine et son co-facteur TCF/LEF est maintenue inactive par le répresseur Groucho et les histones désacétylases (HDAC) (Cavallo et al., 1998; Song et al., 2004) (Figure 19, à gauche).

Les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF sont des facteurs de transcription de type HMG (*high mobility group*). Cette famille est composée de quatre membres : LEF-1, TCF-1, TCF-3 et TCF-4 qui partagent un domaine de fixation à l'ADN similaire. Comme ces facteurs ne possèdent pas de domaine d'activation transcriptionnelle propre, ils s'associent avec des activateurs pour pouvoir exercer leurs fonctions (Archbold et al., 2012).



Figure 18: Interaction de la β -caténine avec les facteurs de transcription (TCF/LEF et Foxo) et les co-activateurs Bcl9 et HATs.

La fixation du ligand Wnt sur son récepteur membranaire LRP5/6 – Frizzled (Fz) induit le recrutement à la membrane des protéines du complexe de destruction ainsi que la protéine Dishevelled (Dvl). Dvl phosphoryle alors la GSK3 β ce qui la rend inactive et n'est donc plus capable de phosphoryler la β -caténine. Cette inhibition entraîne la stabilisation et l'accumulation de la β -caténine nouvellement synthétisée dans le cytoplasme.

Une fraction du pool de β -caténine stabilisée se transloque ensuite dans le noyau où elle interagit avec le facteur de transcription TCF/LEF. Cette interaction permet le recrutement des co-activateurs comme Bcl9, Pygopus et les Histones Acetyl Transférases (HATs)(Saito-Diaz et al., 2013)(Figure 18). L'ensemble de ces protéines contribue alors au recrutement de la machinerie de transcription et à l'expression des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine (Figure 19, à droite).

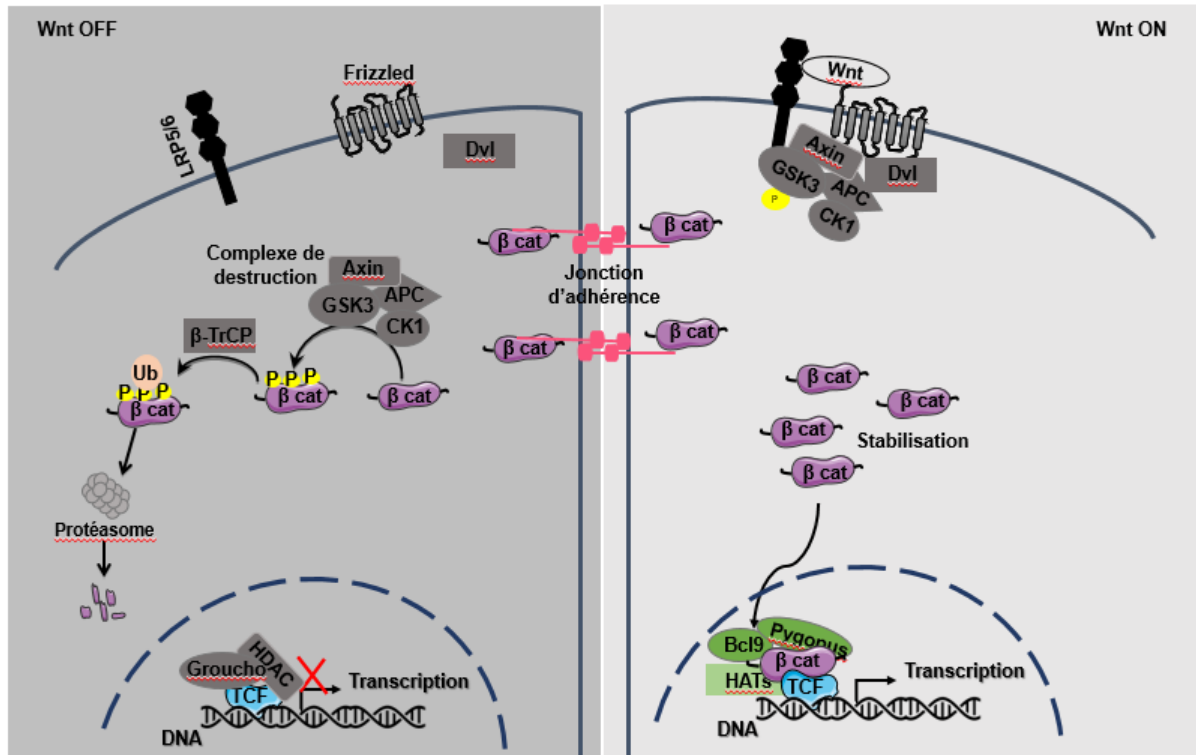


Figure 19: La voie de signalisation Wnt/ β -caténine. En l'absence de signal Wnt, l'excès de β -caténine cytoplasmique est dégradé par le protéasome. En présence de ligand de la famille Wnt, le complexe récepteur-corécepteur (Frizzled-LRP), recrute à la membrane plasmique le complexe de destruction. La β -caténine est donc stabilisée et l'excès cytoplasmique peut maintenant être transporté vers le noyau et s'associer aux facteurs de transcription de la famille LEF/TCF permettant l'activation transcriptionnelle de gènes cibles.

5. Les gènes cibles de la β -caténine

La β -caténine joue le rôle d'un cofacteur de transcription en se liant à des facteurs de transcription qui régulent plusieurs fonctions cellulaires. Le paragraphe qui suit aborde les deux premiers gènes cibles CCND1 et c-Myc identifiés chez l'homme ainsi que le gène le plus connu l'axine, les autres gènes régulés sont classifiés dans le tableau 5 ci-dessous en fonction de leurs implications cellulaires.

Le gène CCND1 code la protéine Cycline D1 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Le rôle central de la Cycline D1 est la régulation de la transition de la phase G1 vers la phase S *via* la formation d'un complexe avec CDK4 et CDK6 (Cyclin Dependent Kinase). L'expression de Cycline D1 est régulée par le couple TCF / β -caténine. Il a été en effet démontré que l'expression d'un dominant négatif de TCF inhibe l'expression de Cycline D1 et induit l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1 (Tetsu and McCormick, 1999). Le proto-oncogène c-Myc a été identifié comme gène cible de la voie Wnt / β -caténine lors d'un criblage de gènes dans

des cellules de cancer colorectal (HT29) exprimant une forme de APC mutée. Ces cellules présentent une forte expression de c-Myc et la restauration de l'expression de l'APC sauvage diminue drastiquement cette surexpression et induit l'apoptose des cellules. La mutation APC stabilise la β -caténine et favorise son activité transcriptionnelle. L'analyse du promoteur de c-Myc a révélé deux sites de fixation du couple TCF4 / β -caténine confirmant la régulation transcriptionnelle de son expression par la voie Wnt / β -caténine (He et al., 1998).

Tableau 5: Les gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine.

Gènes cibles	Fonctions	Références
c-Myc, EGFR, CCND1	Cycle cellulaire ; prolifération	(He et al., 1998), (Tetsu and McCormick, 1999),(Tan et al., 2005)
LEF1, TCF1	Facteur de transcription	(Roose et al., 1999),(Hovanes et al., 2001)
VEGF, MMP7, MMP14, uPAR, CD44, Fibronectine	Angiogenèse, migration	(Mann et al., 1999),(Brabletz et al., 1999; ten Berge et al., 2008; Wielenga et al., 1999; Zhang et al., 2001b)
Lgr5	Marqueur de cellules souches adultes	(Barker et al., 2007)
Axin2, β-TrCP, Dickkopf	Régulation négative de la voie Wnt	(Lustig et al., 2002; Niida et al., 2004; Spiegelman et al., 2000)
Survivin	Apoptose	(Zhang et al., 2001a)
ID2, ITF2, Met	Différenciation cellulaire	(Boon et al., 2002; Kolligs et al., 2002; Rockman et al., 2001)
Wnt3a, Frizzled	Signalisation Wnt	(Willert et al., 2002; Zhang et al., 2009b)
Sox9, Sox17, Oct4, Nanog	Développement embryonnaire	(Blache et al., 2004; Cole et al., 2008; Du et al., 2009b)
c-jun, Jagged-1	Signalisation	(Mann et al., 1999; Rodilla et al., 2009)
Nr-CAM, Claudin-1, E-cadhérine	Adhésion cellulaire	(Conacci-Sorrell et al., 2002; Miwa et al., 2001; ten Berge et al., 2008)
RankL, Ostéoprotégérine,	Différenciation des ostéoclastes	(Glass et al., 2005; Spencer et al., 2006)

Il est à noter que l'activation de la voie Wnt peut également aboutir à la régulation de gènes sans faire intervenir la β -caténine. Cette dernière peut également participer à l'activation de gènes indépendamment de l'activation par Wnt.

6. Activité transcriptionnelle Wnt indépendante

Bien qu'historiquement identifiée dans la voie canonique de signalisation Wnt, la β -caténine est également impliquée dans d'autres voies de signalisations (Felix JB 2015). De ce fait, l'interaction avec le facteur TCF/LEF n'est pas exclusive, la β -caténine peut donc interagir avec d'autres facteurs de transcriptions notamment le facteur de transcription Foxo. La formation du couple Foxo / β -caténine est favorisée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette association diminue l'interaction β -caténine / TCF et induit l'expression des gènes cibles de Foxo impliqués à la fois dans la régulation du cycle cellulaire, le développement osseux (Essers et al., 2005; Hoogeboom and Burgering, 2009; Valenta et al., 2012).

Par ailleurs, au cours du développement, la β -caténine interagit avec le facteur de transcription Oct4 participant ainsi l'expression des gènes Sox17 et Foxa2, impliqués dans la formation de l'endoderme (Ying et al., 2015).

Les protéines (ou facteurs de transcriptions) SMAD sont également des partenaires potentiels de la β -caténine. En effet, la voie Wnt et la voie des SMADs coopèrent afin d'induire la transcription des gènes impliqués dans le développement. A titre d'exemple, dans des cellules épithéliales tubulaires rénales, SMAD3 interagit avec la β -caténine et augmente à la fois sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle. De plus, la stimulation de récepteur TGF β -R conduit à l'interaction de la β -caténine avec Smad1/Smad4. L'ensemble forme alors un complexe transcriptionnel qui contrôle notamment l'expression de c-myc et régule la prolifération et la différenciation de cellules épithéliales rénales (Hu and Rosenblum, 2005; Luo, 2017).

La β -caténine coopère également avec le facteur clé de la voie Hippo impliqué dans la régulation de la taille des organes au cours du développement. En effet, la β -caténine nucléaire forme un complexe transcriptionnel avec Yap et contrôle la taille du cœur en régulant la prolifération des cardiomyocytes (Heallen et al., 2011; Li et al., 2019).

Dans des conditions hypoxiques, la β -caténine s'associe avec HIF1 α conduisant à l'activation de la transcription des gènes cibles de HIF1 α comme *VEGF*. D'ailleurs, la formation du couple

HIF1 α / β -caténine rentre en compétition avec celle du complexe TCF/LEF- β -caténine. Il est intéressant de noter que la phosphorylation de la Tyr 654 de la β -caténine favoriserait son interaction avec HIF1 α indiquant l'importance des MPTs dans la spécificité de l'interaction protéine-protéine (Kaidi et al., 2007; Xi et al., 2013).

La β -caténine peut être à la fois activateur ou répresseur de la transcription, notamment dans le contexte de l'inflammation. En effet, l'interaction avec le facteur de transcription NF κ B permet le recrutement soit d'un co-activateur (comme CBP/P300) ou bien de co-répresseurs (comme Groucho). Le choix entre activation et répression s'effectue en fonction du signal reçu mais également du type cellulaire (Ma and Hottiger, 2016).

L'ensemble des fonctions décrites précédemment peut être régulé via des MPTs de la β -caténine. Ces dernières modulent sa conformation et son affinité pour ses différents partenaires.

7. Modifications post-traductionnelles : impact sur la localisation et les fonctions

La β -caténine contient de nombreux résidus qui sont modifiés post-traductionnellement. Ces modifications sont assurées par des kinases, ubiquitine ligases, phosphatases ou acétyltransférases et permettent à la β -caténine de participer à la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires dans les différents compartiments de la cellule. Une partie de ces modifications est présentée dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6: les modifications post-traductionnelles de la β -caténine. Adapté de Valenta et al., 2012.

Modification	Site	Enzyme	Fonction	Localisation	Référence
Ser/Thr phosphorylation	Ser33, Ser37	GSK3	Dégradation	Cytoplasme	(Liu et al., 1999; Winston et al., 1999)
	Thr41	GSK3	Dégradation	Cytoplasme	(Wu and He, 2006)
	Ser45	CK1	Dégradation	Cytoplasme	(Liu et al., 2002)
	Ser23, Ser29	CK2	Stabilisation	Cytoplasme	(van Noort et al., 2002)

	Thr112	CK2	Adhérence, recrute l'α-caténine	Membrane	(Bek and Kemler, 2002)
	Thr120	PKD1	Inhibition de la signalisation par l'immobilisation de la caténine au niveau du golgi	Cytoplasme	(Du et al., 2009a; Du et al., 2012)
Tyr phosphorylation	Tyr30	SYK	Pas encore défini	Cytoplasme	(Kassouf et al., 2019)
	Tyr86	Bcr-Abl, Abl	Signalisation, stabilisation	Cytoplasme	(Coluccia et al., 2007)
Ubiquitylation	Lys19	SCF ubiquitine ligase	Dégradation	Cytoplasme	(Wu et al., 2003)
Acétylation	Lys49	CBP	Signalisation, activation de la transcription de c-myc	Cytoplasme	(Wolf et al., 2002)
Ser/Thr phosphorylation	Ser191	JNK2	Translocation nucléaire	Noyau	(Wu et al., 2008)
	Ser246	Cdk5	Inhibe la liaison à l'APC	Cytoplasme	(Muñoz et al., 2007)
	Thr393	CK2	Signalisation, stabilisation	Cytoplasme	(Song et al., 2003)
	Ser552	Akt, PKA	Signalisation	Cytoplasme	(Fang et al., 2007)
	Ser605	JNK2	Translocation nucléaire	Noyau	(Wu et al., 2008)

	Ser675	PKA	Signalisation, favorise la liaison de CBP	Cytoplasme	(Fang et al., 2007; van Veelen et al., 2011)
Tyr phosphorylation	Tyr142	Fer/Fyn, Met Syk	Signalisation, diminue la liaison de l' α -caténine régulation de la division cellulaire	Membrane, cytoplasme Noyau Centrosome	(Brembeck et al., 2004; Bustos et al., 2006) (Bhardwaj et al., 2018)
	Tyr333	Src	Signalisation, fonction nucléaire indépendante de Wnt	Noyau	(Yang et al., 2011)
	Tyr489	Abl	Signalisation, perturbe la liaison des N-cadhérines	Cytoplasme	(Rhee et al., 2007)
	Tyr654	Met, Src, Bcr-Abl, Abl	Signalisation, diminue la liaison des cadhérines	Cytoplasme	(Coluccia et al., 2007; Huber and Weis, 2001; van Veelen et al., 2011)
Acétylation	Lys345	p300	Signalisation, augmente la liaison au TCF	Noyau	(Lévy et al., 2004)
	Tyr675	PKA PAK	Signalisation, liaison au CBP. Stabilisation et transcription	Cytoplasme Noyau	(van Veelen et al., 2011) (Fang et al.,

					2007; Zhu et al., 2012)
Ubiquitylation	Lys666 , Lys671	Siah-1	Dégradation	Cytoplasme	(Dimitrova et al., 2010)

7.1. Influence sur l'adhérence cellulaire

L'adhérence cellulaire est régulée particulièrement par le complexe cadhérine/caténine. La phosphorylation de la Tyr142 par les kinases Fer/Fyn ou par le récepteur tyrosine kinase c-Met entraîne la diminution de l'interaction avec l' α -caténine, lève l'interaction avec la cadhérine et par conséquent réduit l'adhérence cellulaire. La libération de la β -caténine des jonctions augmente son niveau cytoplasmique et sa participation à d'autres processus cellulaires notamment la transcription. La phosphorylation de la Tyr654 par les kinases Src, Met ou Bcr-Abl abolit également l'interaction avec les E-cadhérines et permet d'activer la β -caténine. Cette phosphorylation peut également permettre l'interaction avec le facteur hypoxique HIF1 α et induire la transcription de ses gènes cibles (Xi et al., 2013).

Alors que la majorité de la β -caténine se trouve aux sites de contact cellule-cellule au niveau des membranes, un pool cytoplasmique de β -caténine existe également indépendamment des jonctions adhérentes ; là il participe à la signalisation cellulaire.

7.2. Modification du pool cytoplasmique

Le pool cytoplasmique de β -caténine est très contrôlé par les mécanismes de dégradation ou de stabilisation *via* la phosphorylation de divers résidus. Lorsque la β -caténine libre dans le cytoplasme est d'abord phosphorylée par CK1 sur la Ser45 puis phosphorylée par la GSK3 β sur les résidus Ser33/Ser37/Thr41, elle est alors reconnue par le complexe de destruction (Heuberger and Birchmeier, 2010). Les sérines/thréonines phosphatases telles que PP2A déphosphorylent ces formes phosphorylées de la β -caténine (Ser45, Ser33/Ser37/Thr41) non associées à la protéine APC, favorisant ainsi sa stabilisation (Su et al., 2008).

En plus de l'action des phosphatases, la phosphorylation sur la Tyr86 par la kinase Bcr-Abl permet d'inhiber la phosphorylation des résidus Ser33, Ser37 et Thr41 par la GSK3 β et donc la dégradation de la β -caténine (Coluccia et al., 2007). D'autres part, la phosphorylation de la Thr393 par la CK2 déstabilise l'association de la β -caténine avec l'Axin dans le complexe de destruction (Wu et al., 2009), tandis que la phosphorylation de la Ser552 par AKT (PKB)

facilite la libération de la β -caténine depuis les jonctions vers le noyau. Elle favorise également l'association avec la protéine 14-3-3 ζ et la stabilisation ultérieure de la β -caténine (Fang et al., 2007). La kinase PAK1 (p21-activated kinase 1) participe également à la stabilisation de la β -caténine en phosphorylant la Ser675 ce qui diminue la capacité d'ubiquitination par la protéine β -TrCP (Zhu et al., 2012). La protéine Siah-1 quant à elle permet l'ajout direct de chaînes d'ubiquitines sur les Lys666/671 de la β -caténine indépendamment de la présence de phosphorylations (Dimitrova et al., 2010).

Le rôle de la β -caténine dans la signalisation dépend ainsi partiellement de son accumulation nucléaire. La régulation de sa distribution nucléocytoplasmique participe donc à contrôler ses fonctions de signalisation.

7.3. Modification du pool nucléaire et du transport nucléocytoplasmique

Comme la β -caténine ne dispose pas d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Fagotto, 2013), le domaine Armadillo (ARM) très proche structurellement du domaine HEAT de la famille des α/β -importines pourrait assurer cette fonction. La β -caténine rentrerait donc en compétition avec les importines pour la liaison au nucléoporines (Nup) afin d'atteindre le noyau. Cependant, cette translocation nucléaire pourrait aussi impliquer d'autres mécanismes moléculaires dont l'interaction avec les transporteurs de types petites GTPases, des facteurs de transcriptions ou par certaines modifications post-traductionnelles. La figure 20 résume l'ensemble des processus qui régulent la localisation nucléaire de la β -caténine.

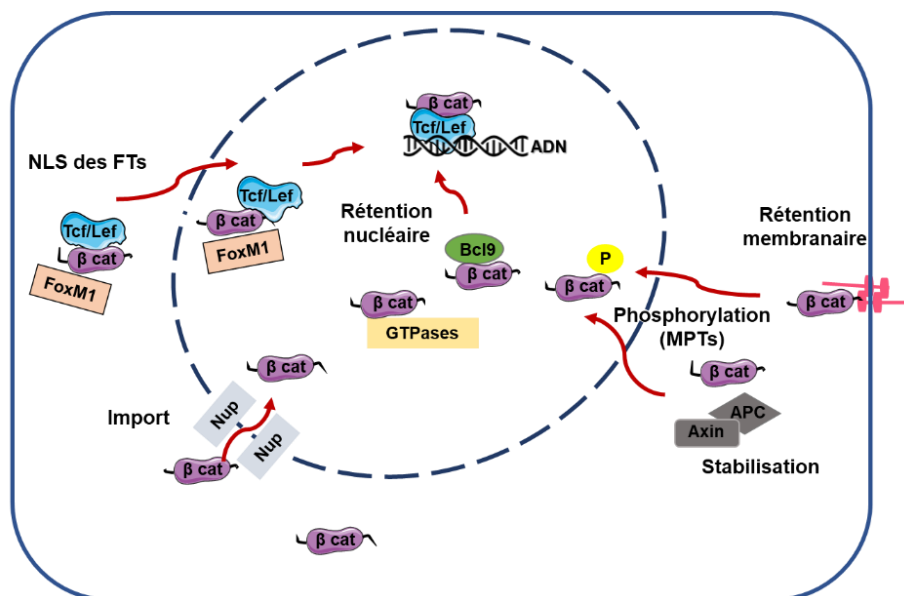


Figure 20 : Facteurs impliqués dans la localisation nucléaire de la β -caténine. Représentation schématique des principaux mécanismes cellulaires qui régulent la localisation nucléaire de la β -caténine. Nup : nucléoporine, β -cat : β -caténine, P : phosphorylation. (Adapté de Rhys et al., 2014)

7.3.1. Les petites GTPases et le transport vers le noyau

La translocation nucléaire de la β -caténine pourrait faire intervenir des mécanismes énergétiques nécessitant une hydrolyse d'ATP/GTP. La déplétion de l'ATP/GTP ou l'utilisation d'un analogue de GTP non hydrolysable inhibe l'import nucléaire de la β -caténine, démontrant l'importance des GTPases dans son transport nucléaire (Fagotto, 2013). Une étude récente a montré d'ailleurs que le facteur d'échange nucléotidique RapGEF5 régule la translocation nucléaire de la β -caténine. En effet, cette dernière interagit avec la forme RapGTP et la déplétion de RapGEF5 diminue drastiquement sa localisation nucléaire et son activité transcriptionnelle dans des embryons de *Xenopus* ou des fibroblastes embryonnaires de souris (Griffin et al., 2018).

L'accumulation nucléaire de la β -caténine en réponse à une stimulation Wnt dépend également de l'activation de la petite GTPase Rac1. Rac1 appartient à la famille Rho qui régule le réarrangement du cytosquelette d'actine. La stimulation Wnt active la kinase JNK2, via Rac1, qui à son tour phosphoryle la β -caténine sur les Ser191 et Ser605 favorisant sa translocation nucléaire. La mutation de ces résidus affecte significativement l'accumulation nucléaire de β -caténine induite par Wnt (Jamieson et al., 2015). D'ailleurs, l'inactivation de Rac1 ou de β -caténine dans l'ectoderme des embryons de souris aboutit à la perturbation de la signalisation Wnt et donc à un arrêt précoce du développement. Rac1 interagit également avec la β -caténine et régule sa translocation nucléaire pour contrôler la croissance cellulaire (Wu et al., 2008). Ces données nous permettent de souligner l'importance cruciale de ces deux partenaires dans la signalisation cellulaire au cours du développement embryonnaire.

7.3.2. Les facteurs de transcriptions et la localisation nucléaire de la β -caténine

Le facteur de transcription Forkhead-box (FoxM1) régule l'expression de certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération et la réparation des dommages à l'ADN. La séquence NLS de FoxM1 facilite sa libre circulation entre le cytoplasme et le noyau. En interagissant avec FoxM1, la β -caténine transite facilement vers le noyau. Les cellules dépourvues de FoxM1 se caractérisent d'ailleurs par une faible localisation nucléaire de la β -caténine associée à une diminution de l'expression des gènes cibles (Zhang et al., 2011).

Une fois dans le noyau, le facteur de transcription LEF/TCF est souvent considéré comme le partenaire principal de la β -caténine. Ce complexe régule en effet une grande majorité de gènes contrôlés par la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. De fait, la surexpression des facteurs de transcriptions LEF/TCF conduit à l'accumulation de la β -caténine dans le noyau favorisant sa translocation et sa séquestration nucléaire (Behrens et al., 1996). Pour autant, une accumulation

nucléaire de la β -caténine est également identifiable dans des cellules qui expriment un faible niveau de LEF/TCF (Simcha et al., 1998).

Il est à souligner que d'autres mécanismes indépendants de l'interaction avec ces FTs ont été décrits faisant intervenir des MPTs susceptibles de réguler la localisation nucléaire de la β -caténine.

7.3.3. Les modifications post-traductionnelles MPTs et la translocation nucléaire de la β -caténine

En plus des résidus Ser191 et Ser605 décrits précédemment, les tyrosines 86, 333 et 654 sont également impliqués dans la localisation nucléaire de la β -caténine. Ces résidus peuvent être phosphorylés par le récepteur EGFR après stimulation par son ligand l'EGF. Cette stimulation induit l'endocytose de la E-cadhérine et augmente le niveau cytoplasmique de la β -caténine phosphorylé sur les tyrosines 86, 333 et 654. Ces phosphorylations favorisent donc sa translocation nucléaire (Valenta et al., 2012).

La kinase Src est également impliquée dans la phosphorylation de la β -caténine sur la tyrosine 333 en aval de l'EGFR. Cette phosphorylation serait essentielle à la localisation nucléaire de la β -caténine et à son interaction avec TCF4 (TCF7L2) (Yang et al., 2011).

La phosphorylation de la Tyr142 dirige la β -caténine localisée au niveau des jonctions vers les voies de signalisation cellulaire. Cette phosphorylation régule également le transport de la β -caténine entre le cytoplasme et le noyau. Elle favorise l'interaction de la β -caténine avec le co-activateur de la transcription Bcl9-2 en augmentant ainsi sa localisation nucléaire pour réguler la migration et la prolifération cellulaire (Brembeck et al., 2004; David et al., 2008; Nager et al., 2015).

7.4. La régulation du pool centrosomique de β -caténine

Bien que les rôles de la β -caténine dans l'adhérence cellulaire et la signalisation Wnt soient largement étudiés, les fonctions de la β -caténine au niveau des centrosomes restent encore à éclaircir.

Il a été récemment montré que la phosphorylation du résidu Tyr142 peut également être assurée par la tyrosine kinase Syk. Cette modification s'effectuerait spécifiquement au niveau des centrosomes et participerait à réguler la séparation des centrioles au cours de la division cellulaire (Bhardwaj et al., 2018; Kassouf et al., 2019).

Par ailleurs, une fraction de la β -caténine qui a échappé à la dégradation est retrouvée au niveau des centrosomes. Ce pool de β -caténine également phosphorylé sur les résidus Ser33, Ser37, Thr41 régule l'établissement du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire (Chilov et al., 2011). La sérine/thréonine kinase Nek2 participe à la stabilisation de ce pool de β -caténine

centrosomique (Bahmanyar et al., 2008). En effet, NEK2 interagit et phosphoryle la β -caténine sur les mêmes sites que la GSK3 β et inhibe l'interaction avec la β -TrCP ce qui bloque la dégradation de la β -caténine par le protéasome. Elle peut donc s'accumuler au niveau des centrosomes (Mbom et al., 2014).

Récemment, il a été montré que la phosphorylation sur la Tyr 142 par la tyrosine kinase Syk au niveau des centrosomes participerait ainsi à la cohésion des centrosomes et l'entrée en mitose (Bhardwaj et al., 2018; Zyss et al., 2005).

8. Implication de la β -caténine dans les cancers

8.1. β -caténine et cancer d'origine épithéliale

La dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine favorise la transformation maligne, la progression tumorale, la dissémination métastatique et la résistance à certaines thérapies classiques. Des études récentes démontrent qu'une signalisation Wnt dysfonctionnelle contribue notamment à l'évasion tumorale conduisant à la résistance contre les thérapies

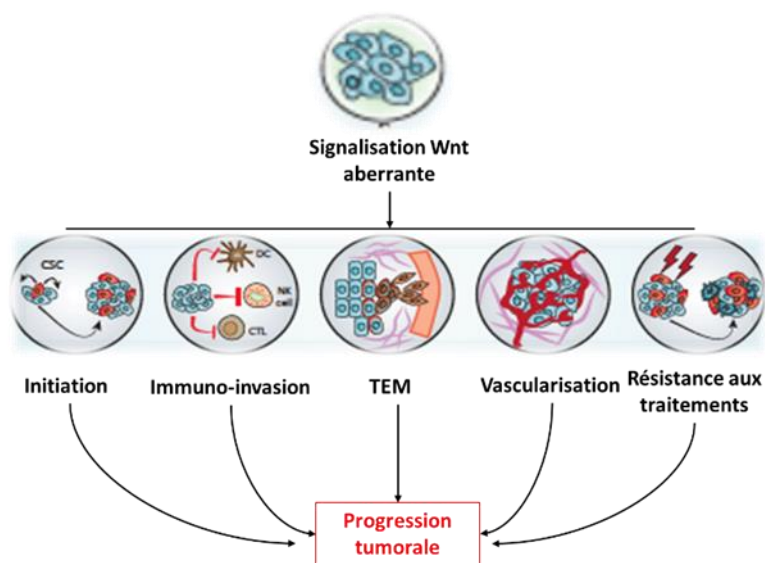


Figure 21 : La dérégulation de la signalisation WNT dans le microenvironnement favorise la transformation maligne et la progression de la maladie par différents mécanismes. Adapté de (Galluzzi et al., 2019)

immunes. Le défaut d'immunosurveillance tout comme les fonctions pro-tumorales résultent d'une signalisation aberrante déclenchée par des mutations oncogéniques (Galluzzi et al., 2019). Les différents mécanismes pro-tumoraux auxquels contribue la dérégulation de la signalisation Wnt sont illustrés dans la Figure 21.

Parmi les carcinomes, trois ont été particulièrement des modèles pour décrypter l'impact de la dysfonction de la voie Wnt : le carcinome colorectal (CRC), le carcinome hépatocellulaire

(HCC) et le cancer du sein. Plus spécifiquement dans le CRC, 80% des patients présentent une mutation de APC. Comme cette protéine est un régulateur négatif de la β -caténine favorisant sa dégradation, les niveaux cytoplasmiques et nucléaires de la β -caténine restent élevés et sont généralement corrélés à un mauvais pronostic. Ces accumulations entraînent la formation d'un complexe stable et constitutivement actif avec le facteur de transcription TCF/LEF, induisant ainsi l'activation des gènes cibles pro-prolifératifs. L'inhibition de l'expression de la β -caténine altère d'ailleurs la prolifération des cellules cancéreuses (Morin et al., 1997; Polakis, 2012).

Des mutations dans le gène β -caténine CTNNB1 ou les régulateurs négatifs de la voie Wnt sont également fréquentes dans le CRC et les carcinomes mammaires. Dans la majorité des cancers, la mutation la plus fréquente est retrouvée dans l'exon 3 codant la région N-terminale qui porte des sites de phosphorylation des Ser/Thr (Hashimoto et al., 2017). Ces sites de phosphorylation de la GSK3 jouent un rôle important dans le complexe de destruction et la régulation des niveaux cellulaires de la β -caténine.

Des dérégulations au niveau des antagonistes de la voie/ β -caténine comme DKK1, GSK3, APC, CTNNBIP1, MCC sont décrites dans les carcinomes mammaires. Par ailleurs, une surexpression de CTNNB1 ou des agonistes comme DVL, LEF1 et une augmentation de l'expression des gènes cibles tels que c-myc, Cyclin D1 et Axin2 sont très fréquentes dans la pathologie (Mukherjee and Panda, 2020).

L'hétérogénéité des altérations génomiques représente une limitation aux traitements des cancers. L'étude génomique à grande échelle de carcinomes hépatocellulaires a révélé que parmi les gènes impliqués dans la tumorigénèse figurent CTNNB1 et AXIN1. L'axine1 phosphorylée par la GSK3 favorise le rapprochement stérique de la β -caténine avec la GSK3. La mutation de l'Axine1 dissocie le complexe de destruction formé par APC, CK1 et GSK3 ce qui favorise l'échappement de la β -caténine vis à vis de la dégradation. La β -caténine libre dans le cytoplasme transloque alors dans le noyau où elle régule l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale et la formation de métastases (Wang et al., 2019).

8.2. Transition épithélio-mésenchymateuse et β -caténine

Nous avons précédemment évoqué le rôle de la β -caténine dans la formation des jonctions d'adhérence. La modulation de l'adhérence cellulaire dans les cancers est connue comme la transition épithélio-mésenchymateuse EMT. Au cours de ce processus les cellules épithéliales subissent des changements morphologiques et acquièrent un phénotype mésenchymateux. Au cours de l'EMT, le remplacement de la E-cadhérine membranaire par la

N-cadhérine libère la β -caténine de la membrane cellulaire. La libération de la β -caténine conduit à une accumulation cytoplasmique et une translocation nucléaire importante aboutissant ainsi à l'expression des gènes impliqués dans l'EMT tels que les facteurs de transcription des familles Snail, Zeb et BHLH (Basu et al., 2018).

La famille des Snails est composée de trois membres (Snail1, Snail2/Slug et Snail3). Les deux premiers membres participent à la répression de l'expression de la E-cadhérine (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Conacci-Sorrell et al., 2003). L'expression de Snail1, Snail2/Slug est régulé positivement par la β -caténine. En effet, l'inactivation de GSK3 β par la voie Wnt prévient la phosphorylation et la dégradation de Snail1, Alors que la β -caténine se fixe directement sur le promoteur de Snail2/Slug et Zeb1 et augmente leur expression (Sánchez-Tilló et al., 2011; Yook et al., 2006; Zhou et al., 2004).

Comme Snail et Zeb, Twist un membre de la famille BHLH régule directement l'expression de la E-cadhérine tout en induisant l'expression de la N-cadhérine et de la fibronectine et induit ainsi l'EMT et l'invasion cellulaire (Yang et al., 2004).

8.3. β -caténine dans les cancers d'origine hématopoïétique

Comme la voie Wnt/ β -caténine est indispensable au développement embryonnaire, elle participe également à l'hématopoïèse. Elle est particulièrement indispensable au contrôle du renouvellement des cellules souches. Elle participe également au maintien du renouvellement des cellules souches leucémiques. La voie Wnt/ β -caténine est d'ailleurs majoritairement responsable de la résistance aux inhibiteurs de tyrosines kinases (TKI) (Grassi et al., 2019). La dérégulation de cette voie a été mise en évidence dans différentes hémopathies comme la leucémie myéloïde aiguë (AML), la leucémie myéloïde chronique (CML), la leucémie lymphoïde chronique (LLC), la leucémie aiguë lymphoblastique (ALL), le myélome multiple (MM) et le lymphome à cellules du manteau (MCL). Les dysfonctionnements observés varient selon ces pathologies et sont majoritairement dus à des mutations ou bien des expressions aberrantes (Soares-Lima et al., 2020). Quelques exemples sont présentés dans le Tableau 4 et dans les paragraphes suivants.

L'hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine observée dans les deux types d'ALL (cellules B et T) peut être due à différents mécanismes : l'expression aberrante de protéines Wnt, des altérations épigénétiques, des mutations activatrices de la β -caténine ou bien des mutations inactivatrices dans les protéines APC ou l'Axine (Chiarini et al., 2020).

Dans l'AML, la β -caténine est fréquemment surexprimée et son expression est corrélée de manière inverse à la survie des patients et à une rechute (Soares-Lima et al., 2020; Ysebaert et al., 2006). Chez plus de 10% des patients, LEF1 régule la translocation nucléaire de la β -caténine. En effet, la déplétion de LEF1 perturbe sa localisation nucléaire et son activité transcriptionnelle. Inversement, la surexpression de LEF1, observable également chez certains patients, favorise à la fois la rétention nucléaire de la β -caténine et son activité transcriptionnelle (Morgan et al., 2019).

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est notamment caractérisée par le chromosome Philadelphie qui résulte d'une translocation réciproque générant la protéine de fusion BCR-ABL1. L'activation de la β -caténine dans la LMC dépend principalement de mécanismes qui empêchent sa dégradation. La protéine BCR-ABL1 phosphoryle les résidus Y86 et Y654 ce qui inhibe le complexe de destruction et favorise la localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de la β -caténine (Coluccia et al., 2007). Sa localisation nucléaire est de plus régulée par des partenaires et particulièrement par la protéine Chibby 1 (CBY1). CBY1 interagit avec le domaine C-term de la β -caténine bloquant ainsi la fixation des facteurs de transcription. La diminution de l'expression de CBY1 dans la LMC, suite à une hyperméthylation de son promoteur, entraîne la rétention nucléaire de la β -caténine activée par BCR-ABL1. A l'inverse, l'induction de l'expression de CBY1 favorise l'exclusion nucléaire, l'inactivation transcriptionnelle et l'induction de l'apoptose des cellules leucémiques (Mancini et al., 2017).

Chez certains patients atteints de lymphome du manteau (LM), on observe l'activation constitutive de la voie canonique Wnt ce qui se traduit par l'accumulation nucléaire de la β -caténine et le maintien de la tumorigénèse (Gelebart et al., 2008). Une autre voie essentielle et largement étudiée est celle du BCR. Il a récemment été montré que la β -caténine peut être stabilisée après stimulation du BCR et que cette stabilisation est abolie après traitement par l'ibrutinib, un inhibiteur de Btk. L'accumulation nucléaire de la β -caténine lui permet d'interagir avec NF- κ B et d'induire la surexpression de Wnt16, indispensable à la survie cellulaire. La β -caténine représente ainsi un nouvel acteur dans la voie du BCR impliquée dans la survie des cellules de MCL (Lazarian et al., 2020b).

La survie des cellules de leucémie lymphoïde chronique (LLC) est étroitement liée à la voie du BCR mais dépend également des voies Notch et Wnt (Kipps et al., 2017). La stabilisation de la β -caténine dans les cellules de LLC est induite suite à l'activation de Notch2 dans des cellules stromales en coculture. La survie des B-LLC est donc dépendante du microenvironnement, de

la stabilisation de la β -caténine en aval de Wnt, mais également de Notch2 (Mangolini et al., 2018). Par ailleurs, des mutations somatiques rares ont été identifiées sur des effecteurs de la voie Wnt dans la LLC. Parmi elles, seules certaines de ces formes mutées contribuent à la survie cellulaire. Ces résultats indiqueraient que même des mutations non récurrentes peuvent contribuer considérablement à la pathogénèse (Wang et al., 2014).

Tableau 7 : Les dérégulations de la β -caténine dans quelques cancers d'origine épithéliale.

Type du cancer	Observations	Références
Cancer colorectal (CRC)	Accumulation de β -caténine Mutation (perte de fonction APC, Axine ou gain de fonction pour β -caténine)	(Bourroul et al., 2016)
Carcinome hépatocellulaire	Accumulation nucléaire de β -caténine Mutation dans l'exon 3 de la β -caténine	(Nhieu et al., 1999)
Cancer du sein	Accumulation nucléaire de β -caténine Y654 Diminution de l'expression des antagonistes (MCC : Mutated in colorectal cancer et CTNNBIP1 ou ICAT : β -catenin interacting protein 1)	(Mukherjee et al., 2016)

Tableau 8 : Les dérégulations de la β -caténine dans quelques hémopathies.

Type du Cancer	Observations	Références
Leucémie aigüe lymphoblastique (T-ALL)	Dérégulation de l'expression des protéines de la voie Wnt/ β -caténine (Fzd, Lef1) Augmentation de l'expression de β -caténine et de ses gènes cibles La déplétion de la β -caténine altère la fréquence des CSL (cellules souches leucémiques)	(Guo et al., 2015) (Ng et al., 2014) (Giambra et al., 2015)
Leucémie lymphoïde chronique LLC	Surexpression de Dvl, Fzd et des ligands Wnt (Wnt5a/b, Wnt3, Wnt16, Wnt10a), Réexpression de Lef1. Diminution de l'expression de DKK.	(Memarian et al., 2009; Poppova et al., 2016) (Gutierrez et al., 2010) (Wang et al., 2014) (Khan et al., 2016) (Moskalev et al., 2012)
Leucémie myéloïde aigüe AML	Augmentation de l'expression de β -caténine et Lef1. Accumulation nucléaire de la β -caténine	(Simon et al., 2005a) (Ysebaert et al., 2006) (Morgan et al., 2013) (Morgan et al., 2019)

Leucémie myéloïde chronique CML	Activation de la β -caténine en aval de BCR-Abl. Accumulation nucléaire de la β -caténine.	(Coluccia et al., 2007)
Lymphome du manteau MCL	Accumulation nucléaire de la β -caténine.	(Gelebart et al., 2008)

Objectifs de thèse

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire incontrôlée. Les altérations des fonctions cellulaires propres aux cellules cancéreuses permettent de modifier la machinerie cellulaire, générant ainsi des nouveaux modes de contrôle distincts de ceux de la cellule normale. Certains de ces nouveaux mécanismes de contrôle opèrent dans le cytoplasme et participent à la régulation de la prolifération cellulaire. Les signaux, en grande partie ceux émis par les récepteurs des facteurs de croissance, sont traités et intégrés par un grand nombre d'acteurs dans le cytoplasme puis transmis souvent au noyau. Ces protéines doivent pouvoir communiquer et le faire avec une grande spécificité et précision. Une protéine de signalisation doit donc reconnaître uniquement les signaux provenant de ses protéines partenaires en amont et les transmettre à ses partenaires en aval.

Vav1 compte parmi ces effecteurs majeurs de la signalisation cellulaire ; identifiés et majoritairement caractérisés dans le système hématopoïétique. L'expression de Vav1 est normalement restreinte au lignage hématopoïétique mais son expression ectopique a été mise en évidence dans différentes pathologies cancéreuses comme les carcinomes pulmonaires, les mélanomes, les neuroblastomes et les tumeurs pancréatiques. Dans le but de mieux comprendre les rôles spécifiques de Vav1 dans des cellules non- hématopoïétiques, notre équipe s'est intéressée à l'identification de partenaires de Vav1. Il a donc été montré précédemment que Vav1 et la β -caténine interagissent aussi bien dans les fibroblastes NIH3T3 que dans la lignée pulmonaire H358 qui exprime ectopiquement Vav1. Parallèlement, une étude avait été initiée pour étudier le lien entre Syk et Vav1 dans la lignée H358 en comparaison avec les éléments connus dans les cellules hématopoïétiques.

Mon travail de thèse s'est donc appliqué à réunir ces deux travaux et à étudier l'interconnexion entre Vav1, Syk et la β -caténine et le rôle de ce trio dans les cellules cancéreuses. Le but ultime de mon projet de recherche était de disposer d'éléments pour commencer à établir le différentiel de la signalisation impliquant Vav1, via ses partenaires Syk et β -caténine, entre le système hématopoïétique et les tumeurs solides.

- Mon premier objectif était d'étudier les liens fonctionnels entre les trois protéines Vav1, Syk, β -caténine par la caractérisation biochimique et fonctionnelle de leur interaction dans la lignée cellulaire de carcinome pulmonaire H358.
- Mon second objectif était d'étudier les liens fonctionnels entre ces protéines dans une pathologie d'origine hématopoïétique : la leucémie lymphoïde chronique.

Résultats

Article: Regulatory interplay between Vav1, Syk and β -catenin occurs in lung cancer cells.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux protéines Syk, Vav1 et β -caténine dans des cellules de carcinome pulmonaire. Nous avons montré que Vav1 interagit avec Syk dans ces cellules tout comme dans les cellules hématopoïétiques. La déplétion de Syk ou son inhibition pharmacologique induit une diminution de la phosphorylation globale des tyrosines de Vav1 mais pas de la tyrosine Y174 de Vav1, phosphorylée par Syk dans les cellules hématopoïétiques. La déplétion de Vav1 ou de Syk ne module pas la prolifération cellulaire mais induit une diminution significative de la migration et de l'invasion cellulaires *via* les GTPases Rac1 et Cdc42.

Nous avons également observé que Syk, comme montré précédemment pour Vav1, interagit avec la β -caténine. Syk, et plus modestement Vav1, sont impliqués dans ses modifications post-traductionnelles mais également dans la régulation de l'expression de certains gènes cibles de la β -caténine. Par ailleurs, nous décrivons pour la première fois une régulation transcriptionnelle inverse de Syk par la β -caténine. Nous avons identifié deux sites de fixation par le complexe β -caténine/TCF4 sur le promoteur de Syk en amont du site d'initiation de la transcription.

Ce travail illustre la collaboration dans un trio des acteurs Vav1-Syk- β -caténine afin de réguler la migration cellulaire. Les interactions au sein même du complexe entre les trois effecteurs régulent leurs fonctions et leur expression stable.

Regulatory interplay between Vav1, Syk and β -catenin occurs in lung cancer cells.

Boudria Rofia^{1,2,3}, Vanessa Laurienté^{1,2,3}, Antonin Oudar^{1,2}, Souleymane Harouna-Rachidi^{1,2},
Christine Le Roy^{1,2}, Laura Gardano^{1,2}, Nadine Varin-Blank^{1,2,4} and Lionel Guittat^{1,2,4}

1. INSERM, UMR 978, Bobigny, France
2. Labex Inflammex, Université Sorbonne Paris Nord, UFR SMBH, Bobigny, France
3. These authors contributed equally.
4. The authors share co-corresponding authorship.

UMR U978 Inserm/Université Sorbonne Paris Nord

74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France

Tel: 33(1) 48 38 88 51 Fax: (33) 1 48 38 76 69

E-mail: nadine.varin@inserm.fr and lionel.guittat@univ-paris13.fr

Abstract

Vav1 exhibits two signal transducing properties as an adaptor protein and a regulator of cytoskeleton organization through its Guanine nucleotide Exchange Factor module. Although the expression of Vav1 is restricted to the hematopoietic lineage, its ectopic expression has been interpreted (unraveled) in a number of solid tumours. In this study, we show that in lung cancer cells, as such in hematopoietic cells, Vav1 interacts with the Spleen Tyrosine Kinase, Syk. Likewise, Syk interacts with β -catenin and, together with Vav1, regulates the phosphorylation status of β -catenin. Depletion of Vav1, Syk or β -catenin inhibits Rac1 activity and decreases cell migration suggesting the interplay of the three effectors to a common signaling pathway. This model is further supported by the finding that in turn, β -catenin regulates the transcription of *Syk* gene expression. This study highlights the elaborated connection between Vav1, Syk and β -catenin and the contribution of the trio to cell migration.

Keywords: Vav1, Syk, β -catenin, regulation, migration

Introduction

Elucidation of the biological mechanisms inherent to the physiological cell state that have been corrupted to drive and maintain the oncogenic cell state is crucial to better understand tumorigenesis as well as to develop new therapies [1, 2]. The proto-oncogene, Vav1, has a restricted hematopoietic expression and exhibits both GTP/GDP exchange activities (GEF) for Rho family GTPases and adaptor functions within a number of signaling complexes [3, 4]. The three members of the Vav family interact with membrane receptors, signaling intermediates, cytoskeleton proteins and nuclear factors [5-7]. The initial characterization of Vav1 consisted in a truncated version of the proto-oncogene that resulted in a transforming protein (onco-Vav) when expressed in fibroblasts [8]. Although this oncogenic form has never been described in neoplasms, an ectopic expression of wild-type or mutated forms of Vav1 is detected in neuroblastoma, medulloblastoma, pancreatic adenocarcinoma, melanoma, breast cancer, T-cell leukemia, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma [9-17]. Depending on tumor cell type, Vav1 regulates cell-cycle progression, proliferation, transformation, migration and invasion [18, 19]. Thus, Vav proteins display a pivotal role in tumorigenesis although far from being fully characterized. Our initial goal was to better understand the different functions of Vav1 affected when expressed ectopically and those of its key partner in hematopoietic cells: the spleen tyrosine kinase, Syk [20]. As Vav1, Syk is expressed at the highest levels in cells of hematopoietic origin and functions as an essential component of the signaling machinery of multiple receptors in the immune system. In addition, there are multiple reports of Syk expression outside of the immune system, particularly in epithelial cells from a variety of organs [21]. In cancer cells, Syk acts as a tumor promoter or a tumor suppressor depending on the cell of origin [22]. In many hematopoietic malignancies, Syk is responsible for cell survival and its inhibition frequently triggers apoptosis. In several other neoplasms, it can suppress tumorigenesis through regulation of motility and metastasis [22, 23]. Vav1 and Syk

independently have been proposed to play a role, in normal and cancers cells, in the regulation of cell plasticity in which functions of β -catenin are crucial [24-26].

β -Catenin is a multifunctional protein with a central role in pathophysiology as well as during development and is a core effector of the canonical Wnt pathway [27, 28]. The stabilization of β -catenin is crucial in tumorigenesis and is induced by constitutive Wnt activation or mutations in the β -catenin itself or in the destruction complex proteins regulating its stability [29]. β -catenin accumulates in the cytoplasm depending on destruction complex activation, and subsequently migrates into the nucleus, where it interacts notably with TCF/LEF transcription factors and induces the transcription of target genes such as *Axin2*, *c-Myc* and *CyclinD1* [30-32]. β -catenin dependent signaling transduction depends on its phosphorylation status which is regimented by a balance of kinases and phosphatases. GSK3 β phosphorylates constitutively β -catenin on the residues Ser33, Ser37 and Thr41 driving it to destruction by the proteasome in absence of Wnt [33]. Binding of Wnt to its receptor Frizzled impairs the triple phosphorylation of β -catenin leading to its stabilization and accumulation. In spite of the triple phosphorylation, phosphorylation of other residues also enhances β -catenin stability [27]. For example, phosphorylation of S675 and Y654 increases β -catenin stability via the inhibition of its ubiquitination [34, 35]. Thus, targeting β -catenin post-translational modifications could represent a valid strategy to challenge cancers driven by active Wnt/ β -catenin signaling.

In this study, we show that Vav1 and Syk interact in a lung carcinoma cell line similarly to hematopoietic cells. Moreover, Syk, like Vav1, interacts with β -catenin and both proteins modulate its post-translational modifications. The three partners regulate migration and invasion through mainly Rac1 but also Cdc42 activity in H358 lung carcinoma cells illustrating their contribution to cell plasticity. Moreover, we identify *SYK* gene as a new β -catenin transcriptional target in epithelial cells. Altogether, these data delineate new lines of research to elucidate the crucial contribution of β -catenin, Syk and Vav1 signaling in cancer cells.

Results

Vav1 interacts with Syk in lung cancer cells

Vav1 and Syk expression was analysed in different lung cancer cell lines (A549, H460, H441, H358 and HCC827) as shown in Figure 1A. H441, H358 cell lines and, to a lesser extent, HCC827 exhibited both Vav1 and Syk expression. At the opposite, undetectable or very low expression of Vav1 and Syk was observed in A549 and H460. Analysis of Vav2 and Vav3 revealed that Vav2 only was detected in all the different cell lines (Supplemental1A). As described in hematopoietic cells, co-expression of Vav1 and Syk in these three cell lines prompted us to inquire whether both proteins interact. Indeed, Syk was detected from Vav1 immunoprecipitates in the different cell lines (Figure 1B). Since the interaction was conserved in epithelial cells, it strongly suggested the existence of a Syk/Vav1 mediated signaling pathway. To examine the contribution of this pathway to the transformed phenotype of lung cancer cells, H358 cells were stably transduced with virally encoded RNA interference (RNAi) hairpin constructs targeting Vav1 or Syk. The knockdown of Vav1 and Syk in H358 cells by two independent hairpins efficiently decreases the two protein levels as compared to a control hairpin (shSCR) (upon 70 % for Syk and 80% for Vav1) (Figure 1C). Vav1 knockdown obtained with the two hairpins was specific and did not affect the expression of the second member of the family: Vav2 (Supplemental 1B). In depleted cells, proliferation in 2D or 3D cell cultures was not impaired suggesting that Vav1 and Syk were not involved in cell-cycle regulation in the cell lines as previously reported for Vav1 (Supplemental 1C and 1D) [15].

Given that phosphorylation on Y174 is critical for relieving Vav1 from its auto-inhibited conformation by Syk in hematopoietic cells [20], we analyzed the level of Y174 phosphorylation in Syk-depleted H358 cells. Using a specific antibody, we did not detect any significant differences in Y174 phosphorylation of Vav1 compared to control cells (Figure 1C

and Supplemental 1E). These results were confirmed by treatment of the cells with 1 μ M R406, a chemical inhibitor of Syk kinase activity. Y174 phosphorylation was not significantly modified by the treatment, in contrast with the inhibition of the phosphorylation of ERK1/2, two downstream targets of Syk (Figure 1D and Supplemental 1F). Thus, Syk in this model was not responsible for Y174 phosphorylation of Vav1 as observed in hematopoietic cells. Immunoprecipitation of Vav1 and western-blotting with a phospho-tyrosine antibody in Syk-depleted or R406-treated cells revealed a large decrease of Vav1 phosphorylation confirming that Syk triggered Vav1 phosphorylation on residues other than Y174 (Figure 1E).

Vav1 and Syk modulate the migration and invasion via Rho GTPase activity.

Migration and invasion are critical steps in the initial progression of cancer and facilitate metastasis. To assess the involvement of Vav1 and Syk in the migration capacity of these lung cancer cells we used scratched wound-healing assays. Depletion of Vav1 or Syk in H358 cells resulted in a significant decrease in cell motility (Figure 2A). Moreover, wound closure relied on Syk kinase activity since its chemical inhibition by R406 impaired also cell migration (Figure 2B). In addition, Syk showed a higher impact on cell migration with a stronger decrease of migration upon its depletion as compared to Vav1. This result also argued for Syk acting as an upstream regulator of Vav1. Meanwhile, overexpression of Vav1 and Syk did not increase significantly cell migration in these wound-healing experiments (Supplemental 2A). We next analysed invasion in a Matrigel Transwell Invasion Assay. Similarly to migration, invasion was significantly impaired in the cell lines depleted for each of the proteins as being involved in cytoskeleton reorganization (Figure 2C). Given that motility and invasion are associated with lamellopodia or invadopodia, we investigated whether the depletion of Vav1 or Syk might impact Rho GTPases including Rac1, RhoA and Cdc42 by using GST pull-down assays. Both knockdown conditions led to substantial decrease in Rac1 and Cdc42 activity without affecting

RhoA activity (Figure 2D). These data were corroborated for Rac1 when Syk and Vav1 were overexpressed in H358 cells (Supplemental 2B). Collectively, our findings suggest that both Vav1 and Syk regulate migration and invasion and both are required for activation of Rac1 and Cdc42. The effect of Syk and Vav on cell migration suggest their involvement in epithelial mesenchymal transition (EMT). In agreement with this hypothesis, both proteins might participate to the acquisition of a mild EMT-like phenotype in these cells as evidenced by a decreased expression of both vimentin and N-cadherin without affecting of E-cadherin levels (Supplemental 2C and 2D). In parallel, we analysed the expression of both c-myc and cyclin D1, two downstream targets of Vav1 and Syk signaling pathway [12, 36]. In Vav1 and Syk-depleted cells, both cyclin D1 and c-myc expression were decreased although cell proliferation was not changed (Figure 2E and Supplemental 2E). Interestingly, both targets are also related to the Wnt/ β -catenin pathway in line with the involvement of Rac GTPase. Since we observed an altered migration phenotype in these cells, we further investigated whether β -catenin that we previously described as a Vav1 interacting protein was involved in this process [37].

β -catenin, a new Syk interacting partner in H358 cells that phenocopies Vav1 and Syk knock-down.

The migration defect observed in depleted cells and the reported interaction between Vav1 and β -catenin prompted us to attest whether Syk might also be a partner of β -catenin in H358 cells. As shown in Figure 3A, β -catenin specifically precipitated with the Syk kinase and reciprocally in these cells. Since β -catenin, as well as Syk and Vav1, plays an important role in cell migration, we analysed the impact of β -catenin depletion on H358 motility using scratched wound-healing assays. β -catenin knock-down efficiency by shRNA or siRNA was estimated by Western-blotting and qRT-PCR. In both conditions, β -catenin protein levels are significantly reduced and migration was impaired (Figure 3B, 3C and Supplemental 3). As already shown

for Vav1 and Syk, downregulation of Rac1 and Cdc42 GTPases activities were observed in line with the deficient migration. Altogether our data suggest that Syk, Vav1 and β -catenin may interact with each other to regulate migration via Rho GTPases (Figure 3D).

Syk and Vav1 modulate the posttranslational modifications of β -catenin.

Considering that β -catenin functions are controlled by a wide variety of post-translational modifications and by its subcellular localization, we first investigated whether the latter was modified in Vav1 and Syk-depleted cells. Subcellular fractionation indicated that β -catenin was present at the membrane, in the cytoplasm and in the nucleus while no obvious difference in β -catenin nuclear accumulation was observed (Figure 4A). This result was confirmed by an immunofluorescence approach (data not shown).

Using commercially available antibodies specific covering several epitopes of β -catenin post-translational modifications, we next verified the status of serine, threonine or tyrosine phosphorylation as well as lysine acetylation upon depletion of Vav1 and Syk. Several modifications were unaffected by the depletion of both proteins (Supplemental 4A). However, phosphorylation of S552, Y142 and Y654 residues were significantly reduced with a more pronounced diminution for Syk inhibition (Figure 4B). These decreases in the phosphorylation status were not associated with an overall reduction of total β -catenin although those have been associated with β -catenin stabilisation in several cell types. These observations were confirmed by the treatment with the Syk inhibitor, R406. However, total β -catenin slightly decreased under such conditions (Figure 4C). Although both Y142 and Y654 phosphorylation have been linked to the nuclear translocation and the transcriptional activity of β -catenin, our fractionation experiment did not evidence nuclear accumulation in absence of Syk (Figure 4A).

To corroborate the results obtained in H358 Syk and Vav1-depleted cells, we used the 293T cells in which low levels of Syk and absence of Vav1 are observed. We expressed a wild-

type or kinase dead mutant of Syk (indicated as KD) was overexpressed or not as well as Vav1. In like manner to H358 cells, Syk and β -catenin coimmunoprecipitate in 293T cells (Figure 4D). As shown in figure 4E, expression of wild-type but not KD Syk led to an increase of Y142 β -catenin phosphorylation. Interestingly, Y142 phosphorylation was enhanced in the presence of Vav1

We previously reported that Vav1 overexpression did not impact the Wnt-dependent β -catenin transcriptional activation in H358 cells [37]. Thus, we sought to verify whether overexpression of Syk might affect β -catenin transcriptional activity. Using the β -catenin-TCF/LEF transcriptional reporter system, we did not observe a significant difference between upon Syk overexpression. However, treatment with LiCl, a potent inhibitor of GSK3 β -dependent degradation of β -catenin results in a substantial induction of the transcriptional response independent of the presence of Syk (Figure 5A). This result confirmed the specific analysis of a Wnt responsive gene Axin2 whose expression was unchanged in both Syk and Vav1 depleted cells (Supplemental 5A).

TCF-4/ β -catenin complex binds to Syk promoter and regulates its expression.

To better evaluate the functional interplay between Syk-Vav and β -catenin we analysed the regulation of Syk and Vav expression in β -catenin depleted cells. Under such conditions, the level of Syk strongly decreased while Vav1 expression remained unchanged (Figure 5B, Supplemental 5B and data not shown). qRT-PCR analysis confirmed the transcriptional downregulation of Syk (Figure 5C). This regulation at the RNA level led us to hypothesize that β -catenin might recognize a regulatory region on Syk promoter. Using Eukaryotic Promoter Database (EPD), three potential binding sites of TCF-4 (TCF7L2)/ β -catenin were characterized in the first 2000 base-pairs upstream region of the Syk promoter (Figure 5D). TCF-4/ β -catenin

binding to the regions covering site 1 (-982), site 2 (-1199) and site 3 (-1580) was analysed by a chromatin immunoprecipitation approach (ChIP). Antibody against the modified H3 (H3K36me3) and TCF4 served as positive controls for immunoprecipitation and binding efficiencies. Both TCF-4 and β -catenin bound respectively Axin2 promoter even in absence of Wnt stimulation as compared to the IgG controls (Supplemental 5D, 5E). Next, we next demonstrated that TCF-4 and β -catenin bind significantly the Syk promoter at sites 1 and 2 but not site 3 (Figure 5C and Supplemental 5F).

To confirm this transcriptional regulation of Syk by β -catenin, we treated the cells with the PKF118-310 inhibitor known to disrupt the interaction between TCF-4 and β -catenin, and preventing β -catenin-dependent gene transcription. Indeed, treatment with PKF118-310 inhibited in a dose-dependent manner Axin2 and Syk transcription (Figure 5E). Collectively, those data indicated that TCF-4/ β -catenin by binding of its promoter region regulates Syk expression.

Discussion

The contribution of Vav1 to human cancer has been shown to stem from its ability to function as a signal transducer in tissues in which it is not normally expressed [4, 38]. Vav1 is tyrosine phosphorylated in response to various stimuli in hematopoietic cells as well as cancer cells [12, 14, 20]. Our study demonstrates that Vav1 also interacts with Syk in lung cancer cells whereas Syk expression in this pathological model remains poorly documented [39-41]. Although co-immunoprecipitation reports an interaction, Syk does not phosphorylate the residue Y174 of Vav1 similarly to a previous report in acute promyelocytic leukemia cells (NB4) [42]. Analysis of the potential tyrosine phosphorylation sites listed via Phosphonet (<http://www.phosphonet.ca>) predicts that Syk might phosphorylate the residues Y604 and Y836 in the SH3 domains and Y844 at the extreme C-terminus. Although both Y604 and Y844 have not been identified as phosphorylated by mass-spectrometry, phosphorylation state of Y836 contributes to the regulation of Vav1 activity [43]. Further work is required to identify critical Vav1 tyrosine(s) that might be phosphorylated by Syk and to elucidate whether this modification contributes to Vav1 specific functions.

Rac1 as a small GTPase behaves as a central molecular node in cellular transformation. First, deregulated activities of upstream factors contribute to constitutive Rac1 dependent pathways. Drivers of the Rac1 signaling pathway, especially some GEFs, are overexpressed, mutated or constitutively active in a number of cancer [45] [46, 47]. Second, mutations within the RAC1 gene are also reported and participate to cellular transformation [44]. Our results indicate that Syk and Vav1 through these GTPases exhibit important roles in migration and invasion of lung cancer cells in agreement with reports on other cancer cell types while an opposite role for Syk has also been reported in other cancer cells [22, 47-49]. Moreover, our data support findings obtained in pancreatic cancer cells demonstrating that the ectopic expression of Vav1 is required for Rac1 and Cdc42 GTPases activities dependent migration and invasion dependent

on [50, 51]. Remarkably, in epithelial cells Vav1 functions through Rac1 and cdc42 whereas in hematopoietic cells Vav1 GEF activity targets preferentially Rac1 and RhoA GTPases without affecting cdc42. This difference underscores Vav1 ability to adjust to other stimuli in various cell types. Altogether, we suggest that Vav1/Syk complex participates to cytoskeleton reorganization required for migration and invasion.

Furthermore, our study strengthens the link between Vav1, Syk and β -catenin evidenced by several groups including our and suggest the existence of a complex with these three partners [37, 47, 52, 53]. We confirmed that Syk is involved in the phosphorylation of β -catenin of both Y654 and Y142 tyrosine residues using knock-down or chemical inhibition. Indeed, it has been recently shown that Syk directly phosphorylates β -catenin at Y142 [53] and we show that Vav1 can enhance this phosphorylation as demonstrated by our depletion and overexpression experiments. When present, Vav1 could reinforce the interaction between Syk and β -catenin, the phosphorylation of the latter and the subsequent signaling. Considering the phosphorylation of the Y654 residue commonly assigned to Src kinase, the non-receptor tyrosine kinase Pyk2 has been recently involved in this phosphorylation in pancreatic cancer cells [54] and could be activated by Syk [55]. Although the phosphorylation of Y142 and Y654 are contributing to β -catenin nuclear shuttling and transcription, we did not observe a significant decrease in the nuclear pool of β -catenin in the Syk depleted cells [34, 56] and the Wnt-dependent transcription of Axin 2 was not affected.

Our present study also demonstrates that inhibition of β -catenin impairs migration of H358 cancer cells. Interestingly, like Vav1 and Syk, this altered migration in β -catenin depleted-cells can also be partially imputable to the lack of activation of Rac1 but not Cdc42. A strong physical interaction between Rac1 and β -catenin in the Wnt pathway signal transduction and Rac1 actively participating to the transcription of β -catenin/TCF target genes are well established [57, 58]. In line with our data, β -catenin is not only an effector of Rac1 but may

reversely acts as an upstream regulator of Rac1. This finding is in agreement with the involvement of the GEFs Tiam1 and Vav2 in triple-negative breast cancer cells [59]. Additional data is needed to figure out how β -catenin acts both as an activator and a effector of Rac1 in various cancer cells. Additional data is needed to figure out how β -catenin acts as an upstream activator and a downstream effector in cancer cells. Since Vav1 and Syk can shuttle between cytoplasm and nucleus and also participate to transcriptional complexes [60, 61], one could speculate that Syk also phosphorylates Vav1 and β -catenin in the nucleus leading to specific gene regulation expression.

Furthermore, this work shed light on a regulation of Syk transcription which has been not extensively studied so far. Regarding the specific expression in cancer cells, promoter investigations focused mainly on the methylation status of Syk gene, which is cell-type dependent [62-66]. We showed that β -catenin/TCF4 is critical for Syk expression, binding directly to the Syk promoter in H358 cells. Importantly, the link between Syk and β -catenin seems regulated at several levels: Syk modifies post-translationally β -catenin and reversely the latter regulates Syk gene transcription via TCF4. β -catenin is also expressed in hematopoietic lineage in which Syk plays crucial functions and such regulation might be relevant in malignant or normal B cells. Moreover, it remains to be examined whether β -catenin could regulate Syk gene expression through its interaction with others co-factors such as NF- κ B, HIF1 α or FOXO. Indeed, Syk promoter harbors putative binding sites for all these transcription factors [27, 67]. Additionally, PU.1 has been ascribed as a singular regulator of Syk expression[68]. Our data show that β -catenin acts as a novel factor involved in Syk gene expression.

Our primary goal was to contribute to the growing list of reports demonstrating a determining role of the ectopic expression of Vav1 in cancer cells [4, 38]. Its biological importance needs further exploration including impact of the GEF activity but also the adaptor function and particularly through partners such as Syk and β -catenin. Despite many open questions relative

to Vav1 contribution to cancer, Vav1 remains a promising target in therapy, especially by blocking its GEF activity like it was demonstrated for the first time in pancreatic cancer. Syk inhibitors as well as β -catenin inhibitors manifest already therapeutic effects on autoimmune disease and B-cells malignancies [69, 70] [28]. With some remaining questions, more studies are required to clarify how this Menage-a-trois operates, while the three partners have independent functions in cancer cells and to translate these findings toward successful treatment in oncology.

Methods

Antibodies

The antibodies used in this study were purchased from different commercial sources and are listed in the following table.

Table 9: Antibodies used in this study.

Antibody Name	Company	Applications
Anti-Vav1	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Vav1 (C14)	Santa Cruz Biotechnology	WB - IP
Anti-Vav1 (B6)	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti- β -actin	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti-tubulin	Sigma	WB
Anti-Syk	Becton Dickinson	WB - IP
Anti-N-cadherin	Becton Dickinson	WB
Anti-E-cadherin	Becton Dickinson	WB
Anti- β -catenin	Becton Dickinson	WB - IP
Anti-Y142- β -catenin	ECM Biosciences	WB
Anti-Y654- β -catenin	ECM Biosciences	WB
Anti-S552- β -catenin	Cell Signaling Technology	WB
Anti-K49-b-catenin	Cell Signaling Technology	WB
Anti-S675- β -catenin	Cell Signaling Technology	WB
Anti-S33/37/T41- β -catenin	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Non-phospho- β -catenin	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Vav2	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti-Vav3	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti-S45- β -catenin	Cell Signaling Technology	WB
Anti-S45/T41- β -catenin	Cell Signaling Technology	WB

Antibody Name	Company	Applications
Anti-Y86- β -catenin	GeneTex	WB
Anti-phospho-ERK1/2	Cell Signaling Technology	WB
Anti-ERK1/2	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Rac1	Pierce – Thermo Scientific	WB
Anti-RhoA	Pierce – Thermo Scientific	WB
Anti-cdc42	Pierce – Thermo Scientific	WB
Anti- β -catenin	Abcam	ChIP
Anti-TCF4	Santa Cruz Biotechnology	ChIP
Mouse IgG	Diagenode	ChIP
Rabbit IgG	Diagenode	ChIP
Anti-H3K36me3	Diagenode	ChIP

Cell culture and treatment

All cells are grown at 37°C in 5% CO₂. H358, H441, H460, A549 and HCC827 cells were cultured in RPMI containing 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (PAA). HEK293T cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and 1% PAA. Syk inhibitor R406 (Euromedex) was used at 1 μ M for 1h. PKF118-310 (Sigma-Aldrich) was used at 0.1, 0.2 and 0.3 μ M for 1h.

Virus Production and Infection

Viral production and infections were carried out as described. Briefly, 293T cells were transfected using Trans-IT (Mirus). Viruses were collected 48 hours post transfection. After infection, target cells were selected with 1 μ g/ml of puromycin. The pLKO.1 shSCR; pLKO.1 shVav1; pLKO.1 shSyk; pLKO.1 sh β -cat lentiviruses were produced by cotransfection with pCMVAR8.2 and pCMV-VSV-G (8:1 ratio). The sequences used for the hairpins are listed in the following table.

Table 10: *shRNA sequences used in this study.*

Gene	Sequence (5' – 3')
Vav1-1	5'-ACTGTACCGGATCACAGAGA-3'
Vav1-2	5'-CGTCGAGGTCAAGCACATTAA-3'
Syk-1	5'-GCAGGCCATCATCAGTCAGAA-3'
Syk-2	5'-CCTTAGCATGTGACTCCTGAA-3'
β -cat1	5'-GAGGTGCTATCTGTCTGCTCTA-3'
β -cat2	5'-GTTGTTATCAGAGGACTAAATA-3'

siRNA, plasmid and transfection

siRNA control or targeting β -catenin were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Plasmids encoding Syk and Kinase Dead-Syk (KD) were gifts from Pr Michael Reth (University of Freiburg). H358 and 293T cell lines were transfected using JetPRIME reagent (Polyplus) and/or Trans-IT (Mirus).

Cell fractionation

Membrane, cytoplasmic and fractions were prepared using the Subcellular cell fractionation kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions starting from 1 million of H358 cell line. Protein concentration was quantitated using the BCA protein assay kit (Pierce).

Immunoprecipitation and western blot analyses

Protein extracts were prepared in NP-40 lysis buffer (50mM Tris-HCL [pH 7.5], 150mM NaCl, 10% glycerol, 1mM EDTA, 1% NP-40) containing protease inhibitors (10 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml pepstatin, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1mM DTT, 25mM β -glycerophosphate, 1mM sodium fluoride and 1mM Na_3VO_4). Proteins were separated by SDS-PAGE transferred to Hybond membrane (Amersham) and probed with appropriate

primary and HRP-conjugated secondary Antibodies. Quantitation was performed using Image Lab 4.10 (Bio-Rad). For immunoprecipitation, cell extracts were incubated overnight with the indicated Antibodies after preclearing during 1 hour. Beads were further washed with the lysis buffer and precipitates were eluted in 4X Laemmli buffer prior to immunoblotting.

Rac1/RhoA/Cdc42 Activation Assays

Rac1/RhoA/Cdc42 activation assays were performed using the Active Rac1/RhoA/Cdc42 Pull-Down and Detection Kit. The assays consist on a GST-pull down experiment with the p21-binding domain of PAK1 or the Rhotekin-binding domain that selectively precipitates active Rac1 or RhoA and Cdc42 respectively from whole cell extracts. Active Rac1 or Cdc42 are quantified by immunoblot analysis using anti-Rac1, anti-Cdc42 and anti-RhoA monoclonal antibodies (Thermo Scientific Pierce).

Wound healing assays

H358 cells were seeded in 24-well plates and grown to 90-95% confluency. Subsequently, a scratch was placed in the middle of the well with a sterile 200 μ l pipette tip. After washing twice with serum-free media, media with only 0,5% FBS was added to the cells to limit cell proliferation. Images were captured immediately after scratching and 24hours using a BD pathway Microscope (Magnification x4). Wound closure after 24H was analysed using ImageJ software according to the ratio: Width of initial wound / Width of final wound. The wound closure value of untreated cells was normalized to 1.

Cell invasion assay

Adhesion assays were carried out by using a Cytoselect 48-well cell invasion assay (Cell Biolabs) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were counted, plated at a density of 1.10^6 cells/mL and incubated for 24 hours at 37°C. After incubation and washings,

adherent cells were detached and lysed in a solution containing a fluorescent dye for 20 min. Fluorescence was monitored at 520 nm using a 96-wells plate reader.

Cell proliferation assay

Cells were seeded into 24 well-plates at a density of 10^5 cells/well and counted at days 1, 2, 3 and 4.

Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay

3D invasion was performed according to protocol described by manufacturer (Cell Biolabs). Briefly, cells were suspended in RPMI complete growth medium at a density of $2 \cdot 10^4$ cells/ml then 200 μ l were dispensed in a round-bottom 96 well-plates then incubated for spheroid formation. Four days later, 100 μ l of BMM (basement membrane like matrice) were added to allow invasion. Arbitrary spheroid area measurements were obtained with ImageJ software using a BD pathway Microscope (at 2.5X magnification).

Luciferase reporter assay

293T cells were seeded in 12-well-plates 24h prior to transfection using JetPrime (Polyplus) with Syk construct, Top-firefly or Fop-firefly negative control luciferase plasmids (Millipore) and Renilla luciferase plasmid under the control of SV40 promoter, pRL(Promega). 48h after transfection, cell lysis was performed using the Passive Lysis buffer followed by the Dual luciferase assay (Promega). Firefly and Renilla luciferase activities were monitored following manufacturer's instructions. LiCl (30mM) treatment was applied 3 hours before lysis. Top-firefly luciferase values were normalized to the respective Renilla and Fop-luciferase values for each treatment.

Chromatin Immunoprecipitation

ChIP assays were performed from approximately $4 \cdot 10^6$ cells per experiment, according to protocol described by manufacturer (ChIP-qPCR Diagenode). Briefly, cells were crosslinked with ChIP cross-link gold (Diagenode) for 30 min at room temperature followed with 1% formaldehyde crosslinking for 10 min. Formaldehyde was quenched by addition of glycine to a final concentration of 0.125 M. Chromatin was sonicated, using Bioruptor (Diagenode). A total of 2–4 μ g of antibody previously bound to beads was added to the sonicated chromatin and incubated overnight at 4 °C. 1% of chromatin used reaction was kept as input DNA. Magnetic beads were washed and chromatin eluted, followed by reversal of the crosslinkings and DNA purification. Resultant ChIP DNA was dissolved in water and used as a template for (in) PCR.

Table 11: Primers used in ChIP assays.

Promoter	Primer Forward	Primer Reverse
Syk site 1	5'-CCCATTTCGCAAATCATTACT-3'	5'-TTCTGCTTCCAGGGTTATTGG-3'
Syk site 2	5'-CAATCCCAGTGGCCATACTT-3'	5'-TTGGAGGTAAGGCAGAGAAAC-3'
Syk site 3	5'-CATCAGGTGAAAGCCTGAGAA-3'	5'-GTCAGCATTATTGGAGATGAACAC-3'
Axin	5'-CGGTTGGCGAAAGTTTGC-3'	5'-GGACTCGGGAGCCTAAAGGT-3'

Quantitative reverse transcription PCR

RNAs were extracted using Trizol Reagent (Invitrogen) followed by RNeasy Mini kit (QIAGEN). Reverse transcription was performed with iScript cDNA Synthesis Kit following the manufacturer's protocol (Biorad). All genes expressions were analyzed by quantitative RT-PCR with SYBR Green reagents using the StepOnePlus™ System instrument (ThermoFisher scientific). Results were normalized to β 2-microglobulin and all experiments were done in triplicate. Primers used for amplification purchased from Eurogentec:

Table 12: Primers used for quantitative RT-PCR

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
E-cadherine	5'-CCGAGGACTTTGGCGTGGGC -3'	5'-TCCCTGTCCAGCTCAGCCCG -3'
N-cadherine	5'-GACCCAAACAGCAACGACGGGT-3'	5'-CTGAGGCGGGTGCTGAATTCCC-3'
Vimentine	5'-GGCTCGTCACCTTCGTGAAT-3'	5'-GCAGAGAAATCCTGCTCTCCT-3'
Syk	5'-AGAAGTTCGACACGCTCTGG-3'	5'-ACATTTCCCTGTGTGCCGAT-3'
β-catenin	5'- CGTGCACATCAGGATACCCA-3'	5'- ATTTCTTCCATGCGGACCCC -3'
Axin2	5'- GGACAGGAATCATTGGCCA -3'	5'- ACCTGCCAGTTTCTTTGGCT -3'
Cyclin D1	5'-ACCTGGATGCTGGAGGTCT-3'	5'-GCTCTTTTTACGGGCTCCA-3'
c-myc	5'- CTCCGTCCTCGGATTCTCTG -3'	5'- CTTGTTCCCTCCTCAGAGTCGC -3'
β-2microglobulin	5'- CTCCGTGGCCTTAGCTGTG -3'	5'- TTTGGAGTACGCTGGATAGCCT -3'

Statistical analysis

Statistical significance was assessed using impaired Student's t test (Prism5.0, Graph Pad Software). P values <0.05 were considered significant with the following degrees: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Figures legends

Figure 1. Interaction between Vav1 and Syk in lung epithelial cancer cell lines. A. Vav1 and Syk protein expressions in lung cancer cell lines. Total cell extracts (50µg) were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies (Abs) and tubulin was used as a loading control. **B.** Total cell extracts (1mg) from the indicated cells were immunoprecipitated (IP) with anti-Vav1 or control IgG antibodies. Immune complexes or total extracts from the different cell lines were analyzed by immunoblotting with the indicated Abs. **C.** Cellular levels of Vav1 phosphorylated on tyrosine 174 (Y174) was analysed in H358 control or knockdown cells **D.** H358 cells were treated prior to analysis. GAPDH was used as a loading control. **E.** Total cell

extracts from H358 control or knockdown H358 cells as well as treated with 1 μ M R406 H358 cells were immunoprecipitated using anti-Vav1 Ab. Immunoprecipitates were analyzed with anti-phospho-tyrosine or anti-Vav1 Abs.

Figure 2. Regulation of cell migration and invasion via Rho GTPases activities. **A.** Control or knockdown H358 cells were analysed in a wound-healing assay. Representative pictures at the indicated time points (mean \pm sem) from three independent experiments are shown relative to the recovery obtained with control cells. (Magnification: X4). **B.** Wound recovery in H358 cell treated with DMSO or 1 μ M R406. Wound closure (mean \pm sem) was calculated relative to control cells **C.** Cell invasion was assessed using a fluorimetric invasion assay on stable knockdown H358 cells over 24 hours. **D.** Rho GTPase activation. Rac1/RhoA/Cdc42 activities were assessed in knockdown cells using GST-pull-down experiments. Total cell extracts were analyzed with the indicated Abs. **E.** RT-qPCR to assess the expression of *c-myc* in knockdown cell lines relative to housekeeping gene expression. Significance was determined by Student's *t* test: **p*< 0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001

Figure 3. Interaction between β -catenin and Syk, impact on cell migration. **A.** Total cell extracts (1mg) from H358 cells were immunoprecipitated using either anti- β -catenin, anti-Syk or isotype IgG Abs. Immune complexes or total extracts were analyzed by sequential immunoblotting with the indicated Abs. **B.** Stable knockdown for β -catenin in H358 cells by virus-based RNAi was determined by immunoblotting and tubulin was used as a loading control. **C.** Control or knockdown H358 cells were subjected to a wound-healing assay. Wound closure was calculated relative to control cells at the indicated times. Representative experiments (mean \pm sem) of three independent assays are shown. **D.** Rho GTPase activation. Rac1/RhoA/cdc42 activities were assessed in stable H358 knockdown cells using GST-pull-

down experiments. Total cell extracts were analyzed as a control with the indicated Abs. (β -ctn : β -catenin).

Figure 4. Syk and Vav1 modulate posttranslational modifications of β -catenin. **A.** β -catenin subcellular localisation. Sequential western blotting was performed with the indicated Abs after subcellular fractionation. Anti-ATP1A1, HSP70 and Lamin B1 Abs were used to assess the purity of the membrane, cytoplasmic and nuclear fractions respectively. β -catenin posttranslational modifications. **B. & C.** Total cell extracts from control and knockdown cells (**B**) or R406 treated cells (**C**) were analyzed by sequential western-blotting with the indicated Abs. Actin was used as a loading control. Phosphorylation of ERK1/2 was used as a positive control of R406 treatment. **D.** Total cell extracts from 293T cells were immunoprecipitated using either anti- β -catenin, anti-Syk or isotype IgG Abs. Immune complexes or total extracts were analyzed by sequential immunoblotting with the indicated Abs. **E.** 293T cells were transfected with the indicated constructs. Total cell lysates were analysed by sequential western blotting with the indicated Abs. Tubulin was used as a loading control.

Figure 5. TCF4/ β -catenin complex binds to Syk promoter and regulates its expression. **A.** TCF/Lef-luciferase reporter activation was evaluated in 293T cells 48h after transfection with the indicated constructs and treatment (Empty-LiCl, Syk-LiCl) or not (Empty, Syk) with 30 mM LiCl. Expression was calculated as a ratio between TOP and FOP luciferase activities. Results are means \pm SD of three independent experiments performed in triplicates. **B.** Protein expression of Syk in β -catenin knockdown H358 cells analyzed by immunoblotting. **C.** mRNA expression was analyzed by RT-qPCR. **D.** Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP). H358 cell extracts were immunoprecipitated with anti- β -catenin or anti-TCF4, antibodies rabbit or mouse IgG were used as negative controls respectively. Primers were designed to amplify

three TCF4 predictive binding sites on Syk promoter. They were used to detect the respective DNA regions in the immunoprecipitate. The fold enrichment was calculated as ratio of $2^{-\Delta CT}$ values of the immunoprecipitate with anti- β -catenin and rabbit IgG control or anti-TCF4 and mouse IgG. The histogram represents the means \pm SEM of six independent ChIP assays. **E.** RT-qPCR assessment of the transcriptional activity of β -catenin in H358 treated cells. Total RNAs were extracted and the Syk expression was analyzed. *Axin2* gene expression was used as a positive control for PKF118-310 treatment. The housekeeping gene used was $\beta 2$ microglobulin. Significance was determined by Student's *t* test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Supplemental 1. Analysis of control or knock-down H358 cells. **A.** Expression of Vav family members. Total cell extracts from H358 cells (A) or knock-down cells (B) were analyzed by immunoblotting with the indicated Abs. Actin and Tubulin were used as loading controls. **C.** Proliferation/invasion of the control and knockdown H358 cells spheroids over time. MCF-7 and MDA-MB231 cell lines were used respectively as negative and positive controls for cell invasion. Cells were treated or not with EGF (20 ng/ml) or not (Brightfield images at a 4X magnification). **D.** Cell proliferation of control or knockdown H358 cells. Cells over time after seeding. Data are the means \pm sem of triplicate analyses. **E.** Quantification of phosphorylated Y174-Vav1 fold in knock down or R406 treated cells. **F.** R406 treatment was evaluated by immunoblotting using anti phospho-ERK1/2 and total ERK1/2.

Supplemental 2. Migration and EMT markers expression under the modulation of Vav1 and Syk knock-down H358 cells. **A.** Stable Vav1 and Syk overexpression in H358 cells. Total cell extracts from H358 control, Vav1- or Syk-transfected stable cell lines were analyzed by immunoblotting with the indicated Abs. Actin was used as a loading control (Left panel). Stable cell lines overexpressing Vav1 or Syk were subjected to a wound-healing assay (Right panel).

Results are relative to control cells (n=3). **B.** Rho GTPase activation. Rac1/RhoA/cdc42 activities were assessed in stable H358 cells overexpressing Vav1 and Syk using GST-pull-down experiments. Total cell extracts were also analyzed by immunoblotting with the indicated Abs. **C.** Cellular levels of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin in control and depleted H358 cells. Total cell extracts (50µg) were analyzed by sequential immunoblotting with the indicated Abs. Actin was used as a loading control. **D.** E-cadherin, N-cadherin and Vimentin mRNA expression in control and knockdown H358 cells. mRNA levels were determined by qPCR relative to housekeeping gene. Results are the means ± sem of three independent experiments realized in triplicates. **E.** RT-qPCR of Cyclin D1 expression. The housekeeping gene used was β2 microglobulin. Results are the means ± sem of three independent experiments realized in triplicates. Statistical significance: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Supplemental 3. Migration of RNAi β-catenin depleted cells. **A.** H358 were transiently transfected with siRNAs targeting β-catenin or a control siRNAs pool. Expression was analysed after 48h. **B.** Cells were subjected to a wound-healing assay.

Supplemental 4. β-catenin posttranslational modifications. Total cell extracts from control and knockdown H358 cells were analyzed by sequential western blotting with the indicated Abs. Actin was used as a loading control.

Supplemental 5. β-catenin regulates Syk gene expression.

A. RT-qPCR to assess the expression of *axin2* in knockdown H358 cell lines relative to housekeeping gene expression **B.** H358 cells were transiently transfected with siRNAs for β-catenin or control siRNAs pool. After 48h, loss of expression was determined by immunoblotting and tubulin was used as a loading control. **C.** Expression of β-catenin and Syk analysed by RT-qPCR. The housekeeping gene used was *β2 microglobulin*. **D.** H358 cell extracts were immunoprecipitated with anti-β-catenin specific or anti-TCF4, antibodies rabbit or mouse IgG were used as negative controls. Axin 2 promoter was used a binding region control. **E.** H3K36me3 was used as a positive control for the chromatin immunoprecipitation.

F. ChIP assay with primers around the TCF4 predictive binding site number 3 present on Syk promoter were used to amplify to detect the DNA in the immunoprecipitate. The fold enrichment was calculated as ratio of $2^{-\Delta\text{CT}}$ values of the immunoprecipitate with anti- β -catenin and rabbit IgG control or anti-TCF4 and mouse IgG. The histogram represents the mean \pm SEM of six independent ChIP assays. Significance was determined by Student's *t* test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

References

- [1] C.L. Chaffer, R.A. Weinberg, How does multistep tumorigenesis really proceed?, *Cancer Discov* 5(1) (2015) 22-4.
- [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144(5) (2011) 646-74.
- [3] X.R. Bustelo, Vav family exchange factors: an integrated regulatory and functional view, *Small GTPases* 5(2) (2014) 9.
- [4] S. Katzav, Vav1: A Dr. Jekyll and Mr. Hyde protein--good for the hematopoietic system, bad for cancer, *Oncotarget* 6(30) (2015) 28731-42.
- [5] G. Lazer, S. Katzav, Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy?, *Cell Signal* 23(6) (2011) 969-79.
- [6] V.L. Tybulewicz, Vav-family proteins in T-cell signalling, *Curr Opin Immunol* 17(3) (2005) 267-74.
- [7] S. Rodríguez-Fdez, X.R. Bustelo, The Vav GEF Family: An Evolutionary and Functional Perspective, *Cells* 8(5) (2019).
- [8] S. Katzav, D. Martín-Zanca, M. Barbacid, vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells, *EMBO J* 8(8) (1989) 2283-90.
- [9] J.D. Campbell, A. Alexandrov, J. Kim, J. Wala, A.H. Berger, C.S. Peadarallu, S.A. Shukla, G. Guo, A.N. Brooks, B.A. Murray, M. Imielinski, X. Hu, S. Ling, R. Akbani, M. Rosenberg, C. Cibulskis, A. Ramachandran, E.A. Collisson, D.J. Kwiatkowski, M.S. Lawrence, J.N. Weinstein, R.G. Verhaak, C.J. Wu, P.S. Hammerman, A.D. Cherniack, G. Getz, M.N. Artyomov, R. Schreiber, R. Govindan, M. Meyerson, C.G.A.R. Network, Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, *Nat Genet* 48(6) (2016) 607-16.
- [10] F. Abate, A.C. da Silva-Almeida, S. Zairis, J. Robles-Valero, L. Couronne, H. Khiabani, S.A. Quinn, M.Y. Kim, M.A. Laginestra, C. Kim, D. Fiore, G. Bhagat, M.A. Piris, E. Campo, I.S. Lossos, O.A. Bernard, G. Inghirami, S. Pileri, X.R. Bustelo, R. Rabadan, A.A. Ferrando, T. Palomero, Activating mutations and translocations in the guanine exchange factor VAV1 in peripheral T-cell lymphomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(4) (2017) 764-769.
- [11] I. Hornstein, E. Pikarsky, M. Groysman, G. Amir, N. Peylan-Ramu, S. Katzav, The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas, *J Pathol* 199(4) (2003) 526-33.
- [12] M.E. Fernandez-Zapico, N.C. Gonzalez-Paz, E. Weiss, D.N. Savoy, J.R. Molina, R. Fonseca, T.C. Smyrk, S.T. Chari, R. Urrutia, D.D. Billadeau, Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis, *Cancer Cell* 7(1) (2005) 39-49.
- [13] R.A. Bartolomé, I. Molina-Ortiz, R. Samaniego, P. Sánchez-Mateos, X.R. Bustelo, J. Teixidó, Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion, *Cancer Res* 66(1) (2006) 248-58.
- [14] G. Lazer, Y. Idelchuk, V. Schapira, E. Pikarsky, S. Katzav, The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumorigenesis, *J Pathol* 219(1) (2009) 25-34.
- [15] S. Sebban, M. Farago, S. Rabinovich, G. Lazer, Y. Idelchuck, L. Ilan, E. Pikarsky, S. Katzav, Vav1 promotes lung cancer growth by instigating tumor-microenvironment cross-talk via growth factor secretion, *Oncotarget* 5(19) (2014) 9214-26.
- [16] J.C. Lindsey, D. Kawachi, E.C. Schwalbe, D.J. Solecki, M.P. Selby, P.J. McKinnon, J.M. Olson, J.T. Hayden, R.G. Grundy, D.W. Ellison, D. Williamson, S. Bailey, M.F. Roussel, S.C. Clifford, Cross-species epigenetics identifies a critical role for VAV1 in SHH subgroup medulloblastoma maintenance, *Oncogene* 34(36) (2015) 4746-57.

- [17] B. Shalom, M. Farago, E. Pikarsky, S. Katzav, Vav1 mutations identified in human cancers give rise to different oncogenic phenotypes, *Oncogenesis* 7(10) (2018) 80.
- [18] M. Menacho-Márquez, R. García-Escudero, V. Ojeda, A. Abad, P. Delgado, C. Costa, S. Ruiz, B. Alarcón, J.M. Paramio, X.R. Bustelo, The Rho exchange factors Vav2 and Vav3 favor skin tumor initiation and promotion by engaging extracellular signaling loops, *PLoS Biol* 11(7) (2013) e1001615.
- [19] C. Citterio, M. Menacho-Márquez, R. García-Escudero, R.M. Larive, O. Barreiro, F. Sánchez-Madrid, J.M. Paramio, X.R. Bustelo, The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells, *Sci Signal* 5(244) (2012) ra71.
- [20] M. Deckert, S. Tartare-Deckert, C. Couture, T. Mustelin, A. Altman, Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product, *Immunity* 5(6) (1996) 591-604.
- [21] A. Mócsai, J. Ruland, V.L. Tybulewicz, The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions, *Nat Rev Immunol* 10(6) (2010) 387-402.
- [22] M.O. Krisenko, R.L. Geahlen, Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer, *Biochim Biophys Acta* 1853(1) (2015) 254-63.
- [23] P.J. Coopman, S.C. Mueller, The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression, *Cancer Lett* 241(2) (2006) 159-73.
- [24] A. Singh, P. Greninger, D. Rhodes, L. Koopman, S. Violette, N. Bardeesy, J. Settleman, A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival, *Cancer Cell* 15(6) (2009) 489-500.
- [25] Y.M. Sung, X. Xu, J. Sun, D. Mueller, K. Sentissi, P. Johnson, E. Urbach, F. Seillier-Moisewitsch, M.D. Johnson, S.C. Mueller, Tumor suppressor function of Syk in human MCF10A in vitro and normal mouse mammary epithelium in vivo, *PLoS One* 4(10) (2009) e7445.
- [26] S. Wakahashi, T. Sudo, N. Oka, S. Ueno, S. Yamaguchi, K. Fujiwara, C. Ohbayashi, R. Nishimura, VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug: a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer, *Transl Res* 162(3) (2013) 181-90.
- [27] T. Valenta, G. Hausmann, K. Basler, The many faces and functions of β -catenin, *EMBO J* 31(12) (2012) 2714-36.
- [28] X. Zhang, L. Wang, Y. Qu, Targeting the β -catenin signaling for cancer therapy, *Pharmacol Res* (2020) 104794.
- [29] M. Koni, V. Pinnarò, M.F. Brizzi, The Wnt Signalling Pathway: A Tailored Target in Cancer, *Int J Mol Sci* 21(20) (2020).
- [30] O. Tetsu, F. McCormick, Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells, *Nature* 398(6726) (1999) 422-6.
- [31] T.C. He, A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Identification of c-MYC as a target of the APC pathway, *Science* 281(5382) (1998) 1509-12.
- [32] E.H. Jho, T. Zhang, C. Domon, C.K. Joo, J.N. Freund, F. Costantini, Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway, *Mol Cell Biol* 22(4) (2002) 1172-83.
- [33] J.L. Stamos, W.I. Weis, The β -catenin destruction complex, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(1) (2013) a007898.
- [34] Y. Xi, Y. Wei, B. Sennino, A. Ulsamer, I. Kwan, A.N. Brumwell, K. Tan, M.K. Aghi, D.M. McDonald, D.M. Jablons, H.A. Chapman, Identification of pY654- β -catenin as a critical co-factor in hypoxia-inducible factor-1 α signaling and tumor responses to hypoxia, *Oncogene* 32(42) (2013) 5048-57.

- [35] G. Zhu, Y. Wang, B. Huang, J. Liang, Y. Ding, A. Xu, W. Wu, A Rac1/PAK1 cascade controls β -catenin activation in colon cancer cells, *Oncogene* 31(8) (2012) 1001-12.
- [36] H. Sun, D.C. Lin, Q. Cao, B. Pang, D.D. Gae, V.K.M. Lee, H.J. Lim, N. Doan, J.W. Said, S. Gery, M. Chow, A. Mayakonda, C. Forscher, J.W. Tyner, H.P. Koeffler, Identification of a Novel SYK/c-MYC/MALAT1 Signaling Pathway and Its Potential Therapeutic Value in Ewing Sarcoma, *Clin Cancer Res* 23(15) (2017) 4376-4387.
- [37] L. Razanadrakoto, F. Cormier, V. Laurienté, E. Dondi, L. Gardano, S. Katzav, L. Guittat, N. Varin-Blank, Mutation of Vav1 adaptor region reveals a new oncogenic activation, *Oncotarget* 6(4) (2015) 2524-37.
- [38] M. Farago, T. Yarnitzky, B. Shalom, S. Katzav, Vav1 mutations: What makes them oncogenic?, *Cell Signal* 65 (2020) 109438.
- [39] S.W. Dong, L. Ma, N. Xu, H.Q. Yan, H.Y. Liu, Y.W. Li, P. Zhang, Research on the reactivation of Syk expression caused by the inhibition of DNA promoter methylation in the lung cancer, *Neoplasma* 58(1) (2011) 89-95.
- [40] A.R. Udyavar, M.D. Hoeksema, J.E. Clark, Y. Zou, Z. Tang, Z. Li, M. Li, H. Chen, A. Statnikov, Y. Shyr, D.C. Liebler, J. Field, R. Eisenberg, L. Estrada, P.P. Massion, V. Quaranta, Co-expression network analysis identifies Spleen Tyrosine Kinase (SYK) as a candidate oncogenic driver in a subset of small-cell lung cancer, *BMC Syst Biol* 7 Suppl 5 (2013) S1.
- [41] A. Singh, J. Settleman, Oncogenic K-ras "addiction" and synthetic lethality, *Cell Cycle* 8(17) (2009) 2676-7.
- [42] V. Bertagnolo, S. Grassilli, S. D'Aguzzo, F. Brugnoli, A. Bavelloni, I. Faenza, E. Nika, A. Urbani, L. Cocco, S. Capitani, Mass spectrometry-based identification of Y745 of Vav1 as a tyrosine residue crucial in maturation of acute promyelocytic leukemia-derived cells, *J Proteome Res* 9(2) (2010) 752-60.
- [43] M. Barreira, S. Fabbiano, J.R. Couceiro, E. Torreira, J.L. Martínez-Torrecuadrada, G. Montoya, O. Llorca, X.R. Bustelo, The C-terminal SH3 domain contributes to the intramolecular inhibition of Vav family proteins, *Sci Signal* 7(321) (2014) ra35.
- [44] A.C. Cannon, C. Uribe-Alvarez, J. Chernoff, RAC1 as a Therapeutic Target in Malignant Melanoma, *Trends Cancer* 6(6) (2020) 478-488.
- [45] X.R. Bustelo, RHO GTPases in cancer: known facts, open questions, and therapeutic challenges, *Biochem Soc Trans* 46(3) (2018) 741-760.
- [46] M. Cooke, M.J. Baker, M.G. Kazanietz, Rac-GEF/Rac Signaling and Metastatic Dissemination in Lung Cancer, *Front Cell Dev Biol* 8 (2020) 118.
- [47] T. Kassouf, R.M. Larive, A. Morel, S. Urbach, N. Bettache, M.C. Marcial Medina, F. Mèrezègue, G. Freiss, M. Peter, F. Boissière-Michot, J. Solassol, P. Montcourrier, P. Coopman, The Syk Kinase Promotes Mammary Epithelial Integrity and Inhibits Breast Cancer Invasion by Stabilizing the E-Cadherin/Catenin Complex, *Cancers (Basel)* 11(12) (2019).
- [48] S. Luangdilok, C. Box, L. Patterson, W. Court, K. Harrington, L. Pitkin, P. Rhys-Evans, P. O-charoenrat, S. Eccles, Syk tyrosine kinase is linked to cell motility and progression in squamous cell carcinomas of the head and neck, *Cancer Res* 67(16) (2007) 7907-16.
- [49] X. Wang, M. Mychajlowycz, C. Lau, C. Gutierrez, J.A. Scott, C.W. Chow, Spleen tyrosine kinase mediates BEAS-2B cell migration and proliferation and human rhinovirus-induced expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8, *J Pharmacol Exp Ther* 340(2) (2012) 277-85.
- [50] G.L. Razidlo, C. Magnine, A.C. Sletten, R.M. Hurley, L.L. Almada, M.E. Fernandez-Zapico, B. Ji, M.A. McNiven, Targeting Pancreatic Cancer Metastasis by Inhibition of Vav1, a Driver of Tumor Cell Invasion, *Cancer Res* 75(14) (2015) 2907-15.
- [51] G.L. Razidlo, B. Schroeder, J. Chen, D.D. Billadeau, M.A. McNiven, Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly, *Curr Biol* 24(1) (2014) 86-93.

- [52] R.M. Larive, S. Urbach, J. Poncet, P. Jouin, G. Mascré, A. Sahuquet, P.H. Mangeat, P.J. Coopman, N. Bettache, Phosphoproteomic analysis of Syk kinase signaling in human cancer cells reveals its role in cell-cell adhesion, *Oncogene* 28(24) (2009) 2337-47.
- [53] D. Bhardwaj, M. Náger, A. Visa, M.C. Sallán, P.J. Coopman, C. Cantí, J. Herreros, Phosphorylated Tyr142 β -catenin localizes to centrosomes and is regulated by Syk, *J Cell Biochem* 119(4) (2018) 3632-3640.
- [54] C. Gao, G. Chen, D.H. Zhang, J. Zhang, S.F. Kuan, W. Hu, F. Esni, X. Gao, J.L. Guan, E. Chu, J. Hu, PYK2 Is Involved in Premalignant Acinar Cell Reprogramming and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Maintenance by Phosphorylating β -Catenin, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 8(4) (2019) 561-578.
- [55] H. Okazaki, J. Zhang, M.M. Hamawy, R.P. Siraganian, Activation of protein-tyrosine kinase Pyk2 is downstream of Syk in FcepsilonRI signaling, *J Biol Chem* 272(51) (1997) 32443-7.
- [56] M. Náger, M. Santacana, D. Bhardwaj, J. Valls, I. Ferrer, P. Nogués, C. Cantí, J. Herreros, Nuclear phosphorylated Y142 β -catenin accumulates in astrocytomas and glioblastomas and regulates cell invasion, *Cell Cycle* 14(22) (2015) 3644-55.
- [57] X. Wu, X. Tu, K.S. Joeng, M.J. Hilton, D.A. Williams, F. Long, Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling, *Cell* 133(2) (2008) 340-53.
- [58] S. Esufali, B. Bapat, Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation, *Oncogene* 23(50) (2004) 8260-71.
- [59] P. De, J.H. Carlson, T. Jepperson, S. Willis, B. Leyland-Jones, N. Dey, RAC1 GTP-ase signals Wnt-beta-catenin pathway mediated integrin-directed metastasis-associated tumor cell phenotypes in triple negative breast cancers, *Oncotarget* 8(2) (2017) 3072-3103.
- [60] D. Gao, L. Wang, H. Zhang, X. Yan, J. Yang, R. Zhou, X. Chang, Y. Sun, S. Tian, Z. Yao, K. Zhang, Z. Liu, Z. Ma, Spleen tyrosine kinase SYK(L) interacts with YY1 and coordinately suppresses SNAI2 transcription in lung cancer cells, *FEBS J* 285(22) (2018) 4229-4245.
- [61] M. Houlard, R. Arudchandran, F. Regnier-Ricard, A. Germani, S. Gisselbrecht, U. Blank, J. Rivera, N. Varin-Blank, Vav1 is a component of transcriptionally active complexes, *J Exp Med* 195(9) (2002) 1115-27.
- [62] J. Blancato, A. Graves, B. Rashidi, M. Moroni, L. Tchobe, M. Ozdemirli, B. Kallakury, K.H. Makambi, C. Marian, S.C. Mueller, SYK allelic loss and the role of Syk-regulated genes in breast cancer survival, *PLoS One* 9(2) (2014) e87610.
- [63] S.H. Shin, K.H. Lee, B.H. Kim, S. Lee, H.S. Lee, J.J. Jang, G.H. Kang, Downregulation of spleen tyrosine kinase in hepatocellular carcinoma by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis, *Lab Invest* 94(12) (2014) 1396-405.
- [64] Z. Yang, L. Huo, H. Chen, B. Ni, J. Xiang, L. Kang, L. Wang, J. Peng, Y. Yuan, J. Wang, Hypermethylation and prognostic implication of Syk gene in human colorectal cancer, *Med Oncol* 30(2) (2013) 586.
- [65] Q. Jin, C. Liu, C. Yan, B. Tao, Z. Li, Z. Cai, 5-aza-CdR induces the demethylation of Syk promoter in nasopharyngeal carcinoma cell, *Gene* 511(2) (2012) 224-6.
- [66] C. Yan, C. Liu, Q. Jin, Z. Li, B. Tao, Z. Cai, The promoter methylation of the Syk gene in nasopharyngeal carcinoma cell lines, *Oncol Lett* 4(3) (2012) 505-508.
- [67] G. Lazarian, C. Friedrich, A. Quinquenel, J. Tran, S. Ouriemmi, E. Dondi, A. Martin, I. Mihoub, D. Chiron, C. Bellanger, C. Fleury, P. Gelebart, E. McCormack, D. Ledoux, C. Thieblemont, J. Marzec, J.G. Gribben, F. Cymbalista, N. Varin-Blank, L. Gardano, F. Baran-Marszak, Stabilization of beta-catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF-kB target genes transcription in mantle cell lymphoma, *Oncogene* 39(14) (2020) 2934-2947.

- [68] Y. Oda, K. Kasakura, I. Fujigaki, A. Kageyama, K. Okumura, H. Ogawa, T. Yashiro, C. Nishiyama, The effect of PU.1 knockdown on gene expression and function of mast cells, *Sci Rep* 8(1) (2018) 2005.
- [69] G.M. Deng, V.C. Kyttaris, G.C. Tsokos, Targeting Syk in Autoimmune Rheumatic Diseases, *Front Immunol* 7 (2016) 78.
- [70] D.G. Efremov, S. Turkalj, L. Laurenti, Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies, *Cancers (Basel)* 12(6) (2020).

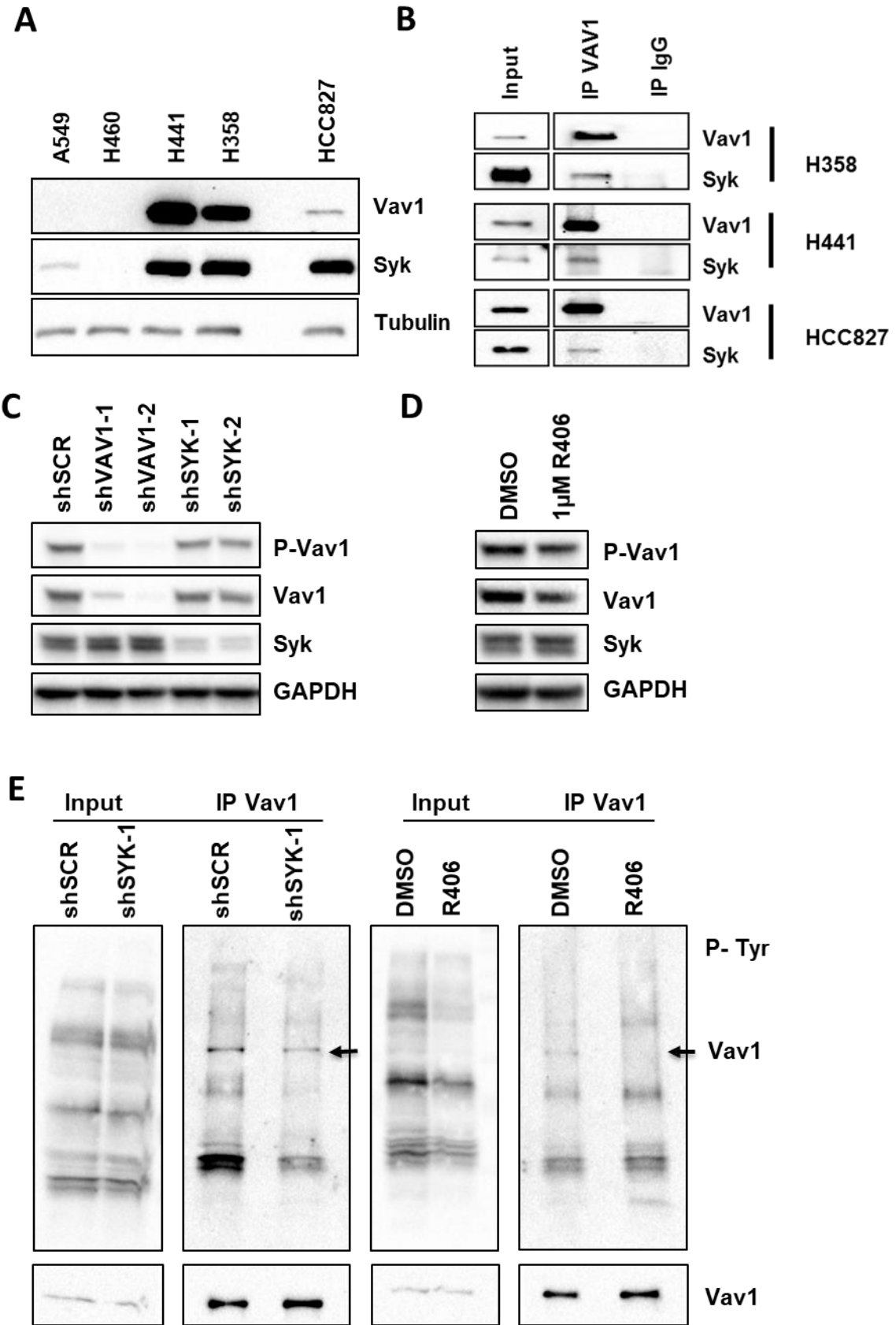


Figure 1

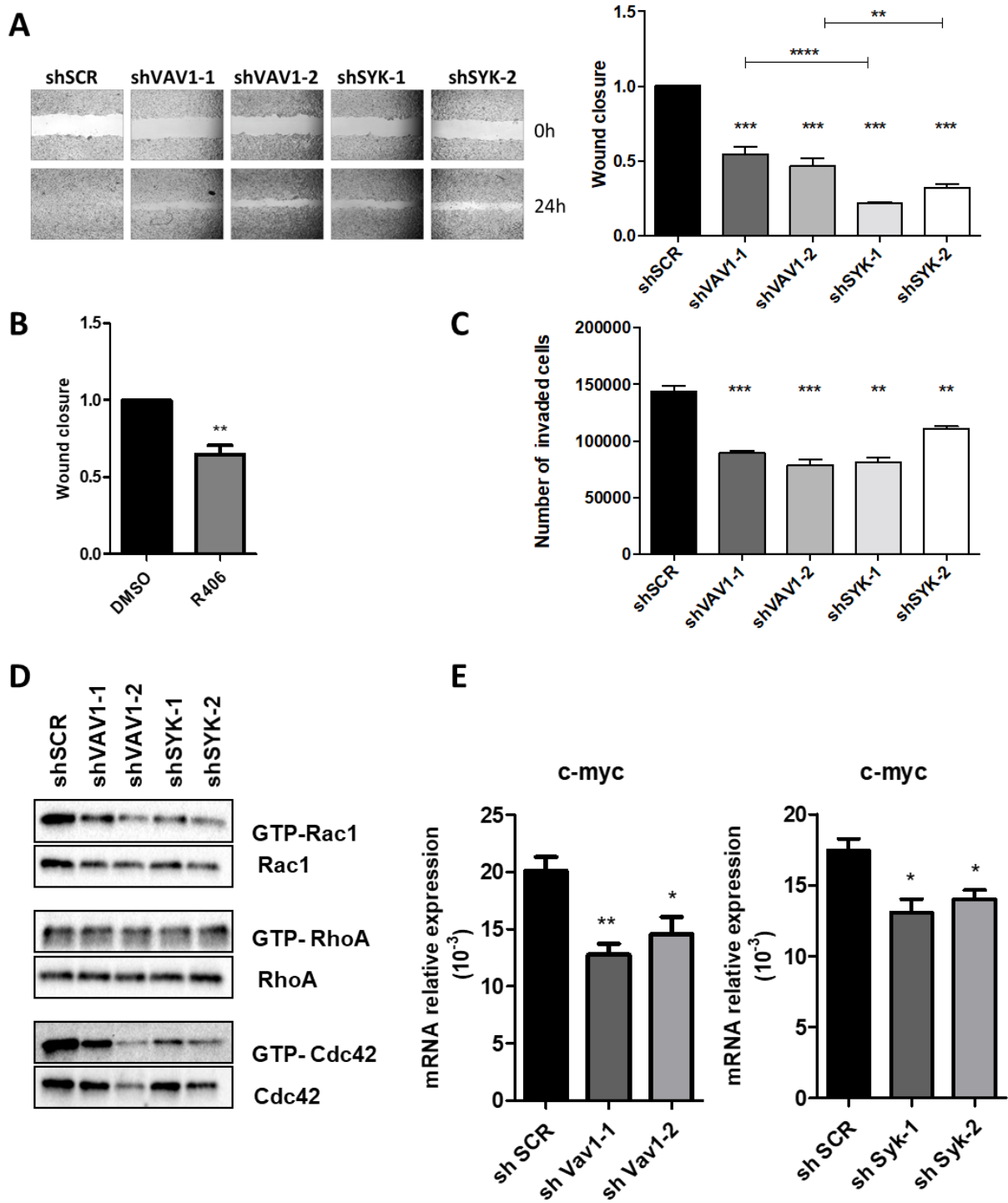


Figure 2

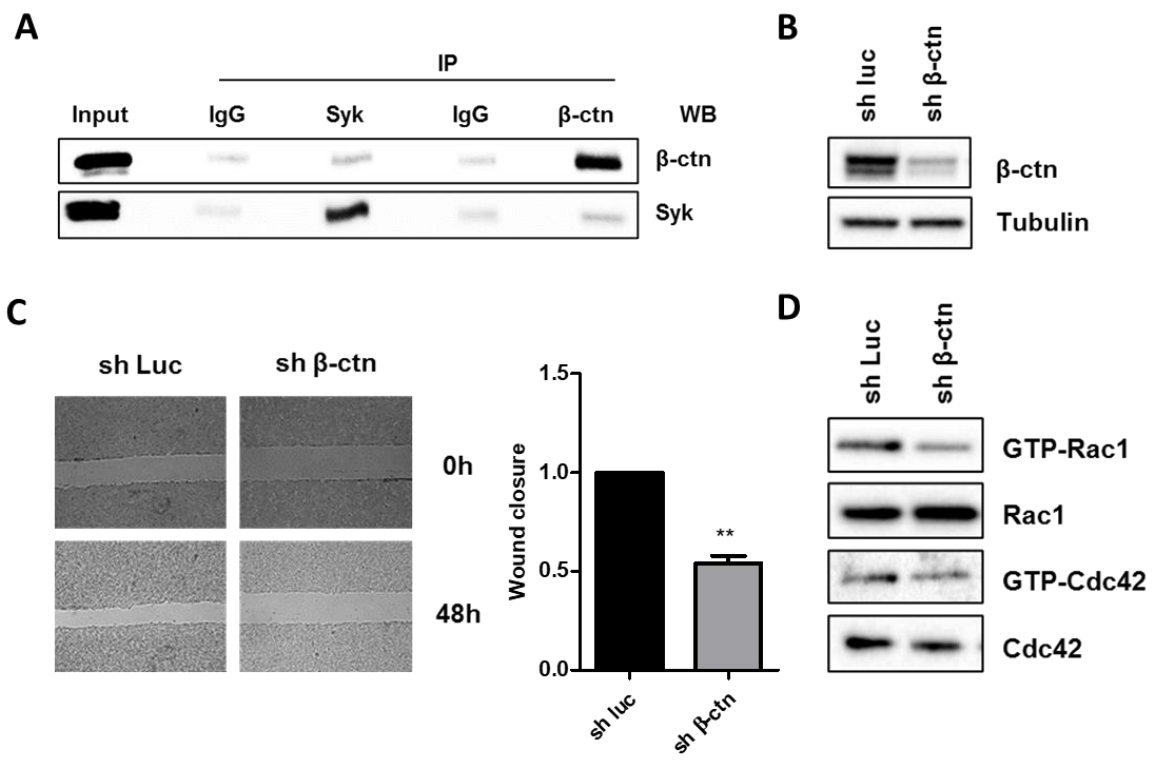


Figure 3

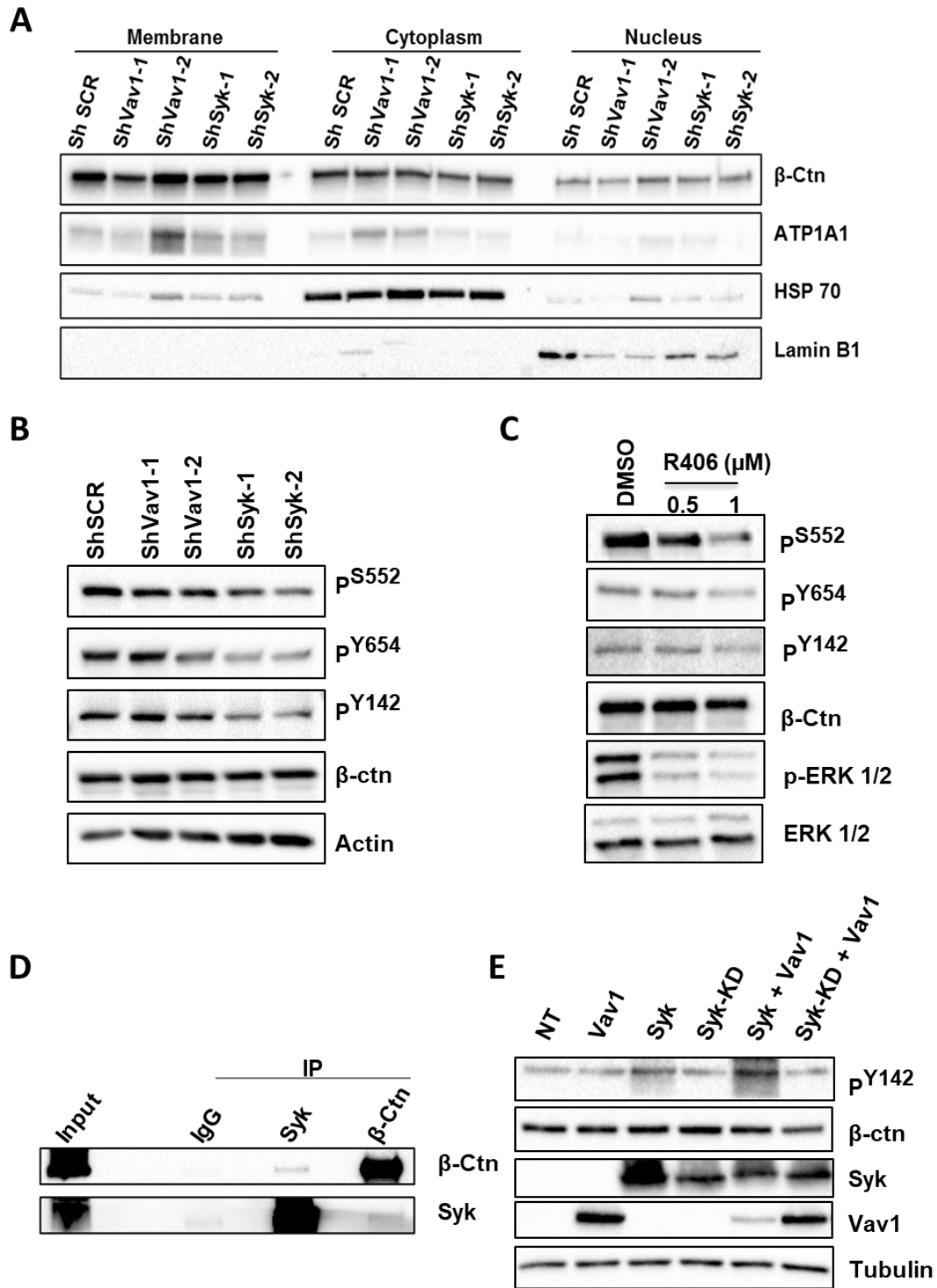


Figure 4

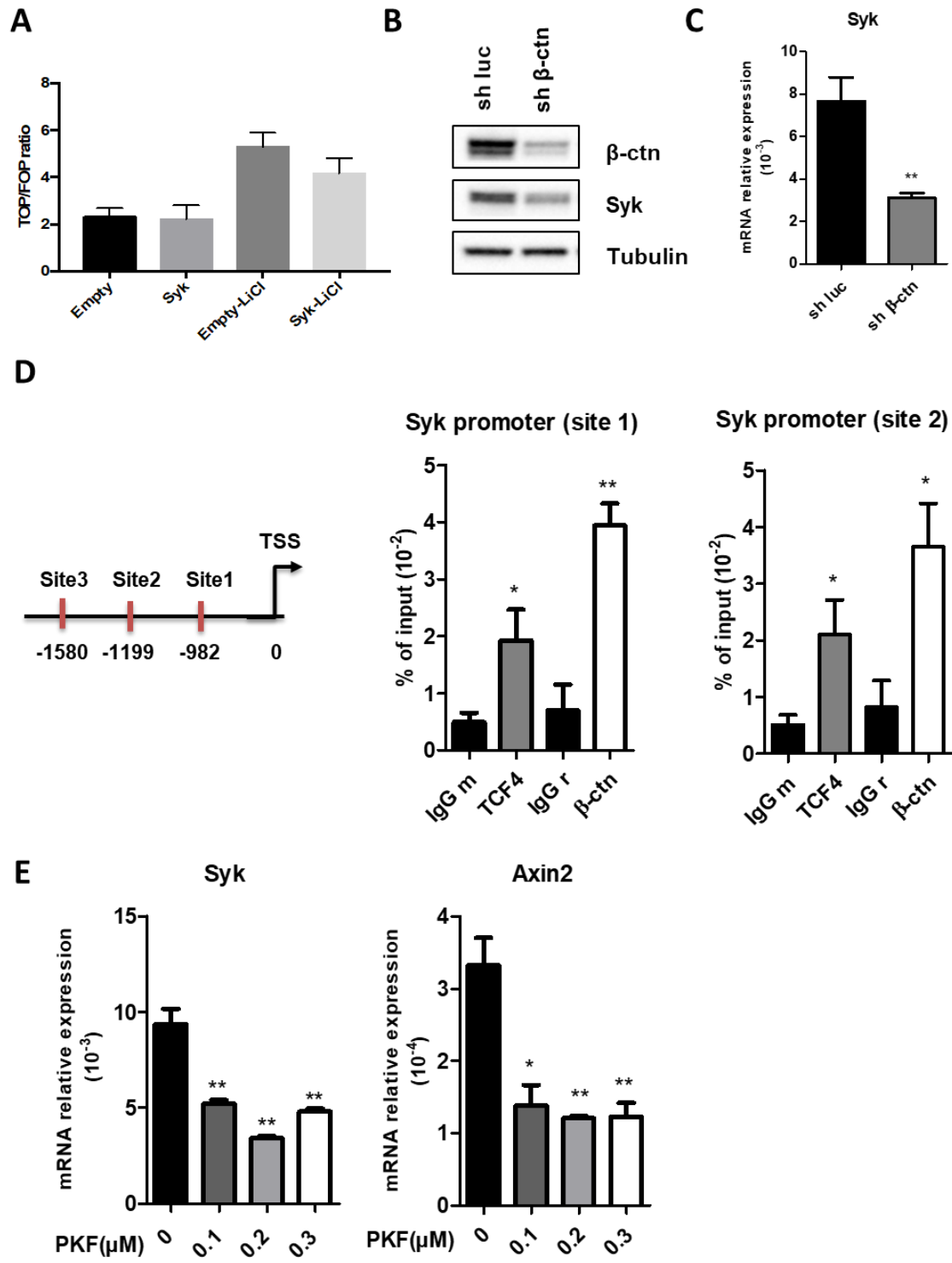
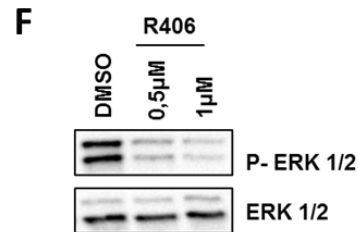
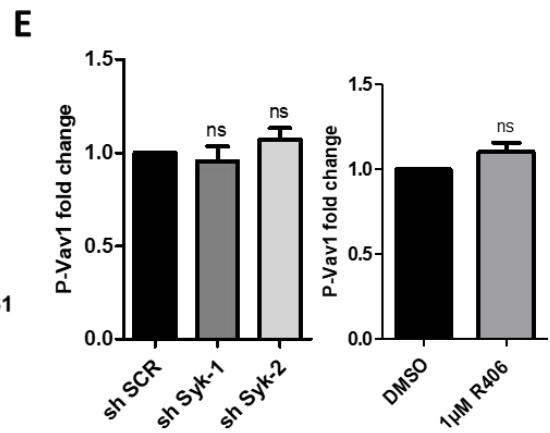
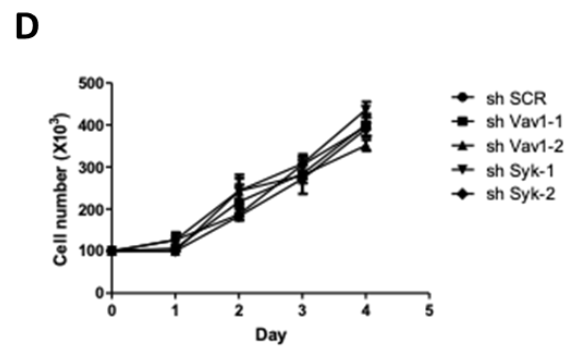
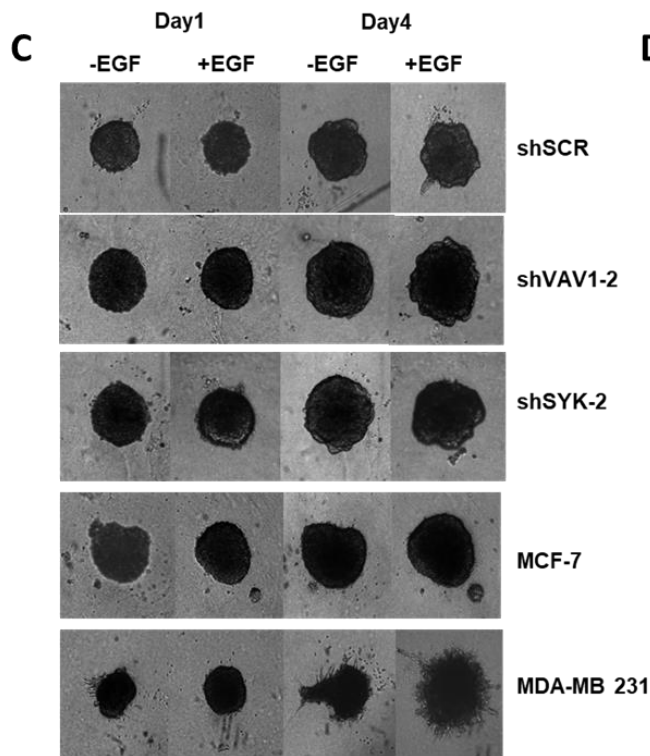
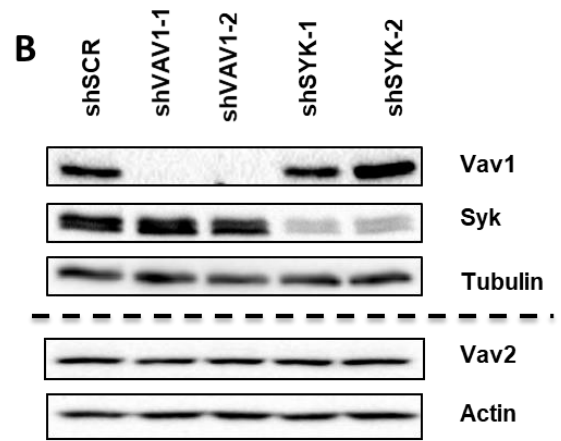
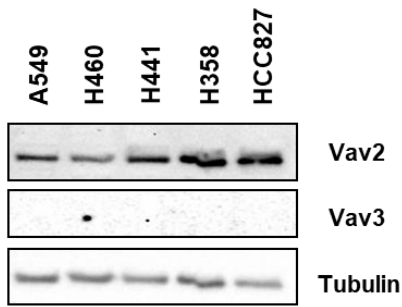
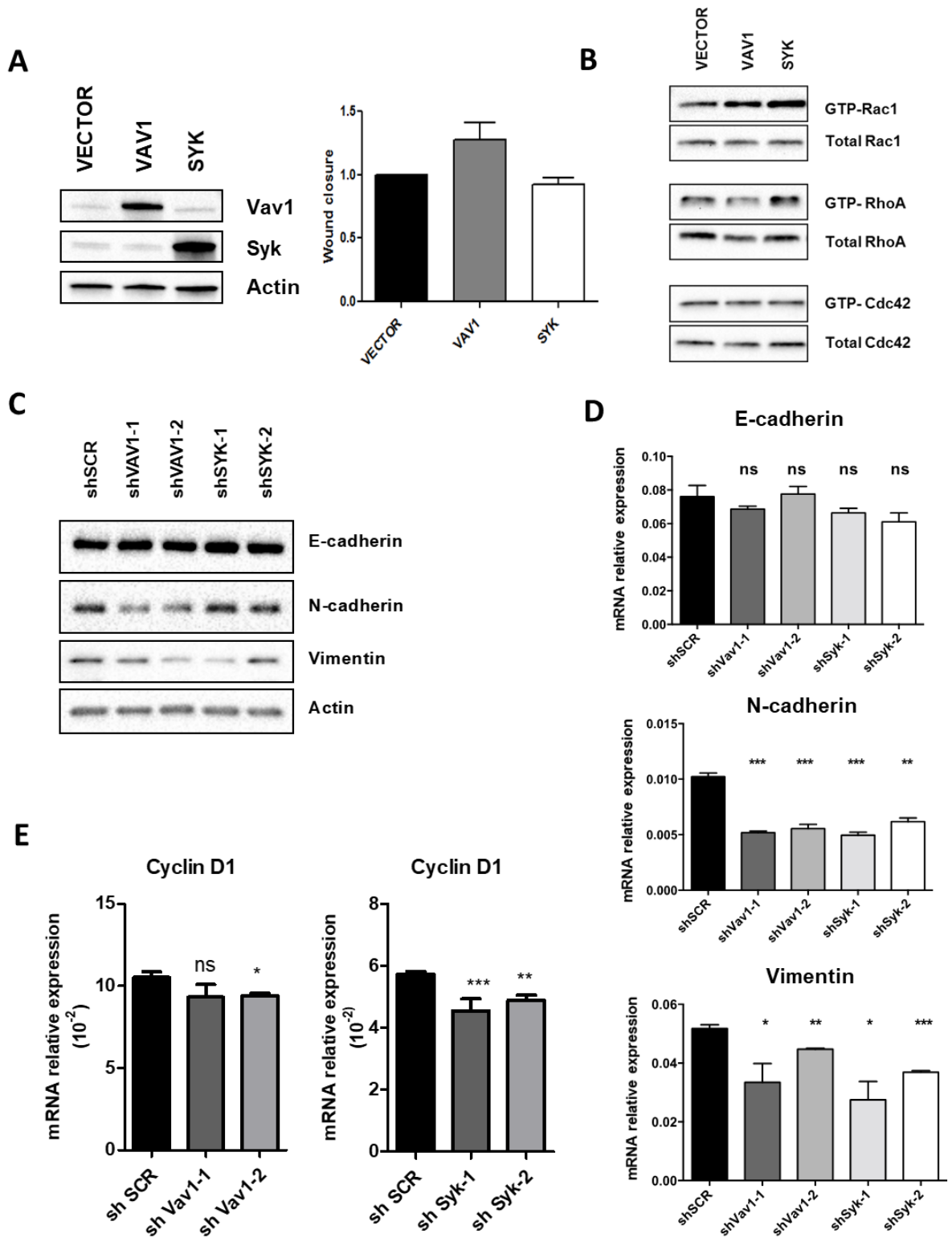


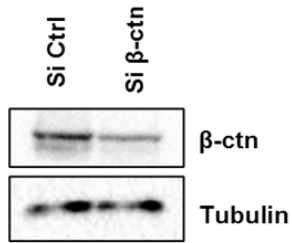
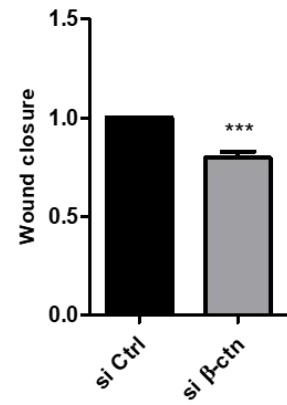
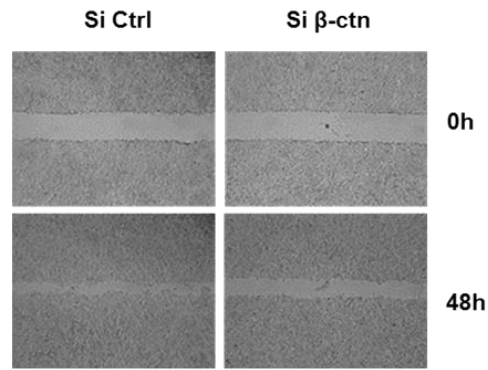
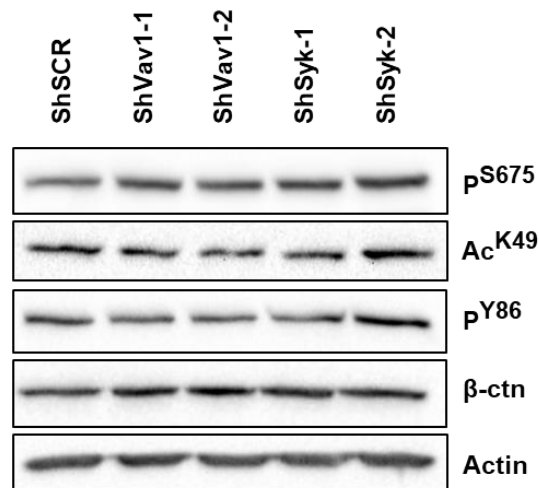
Figure 5

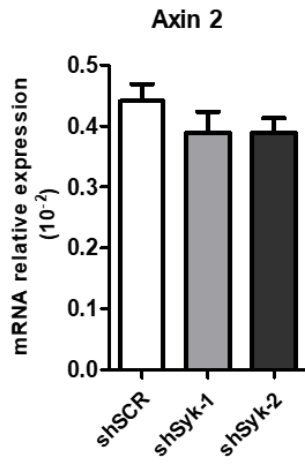
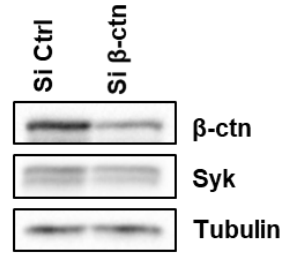
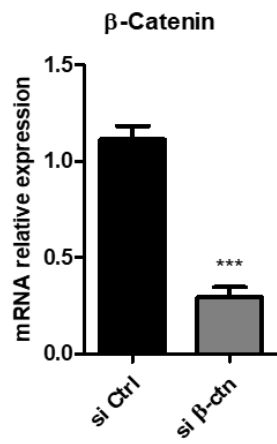
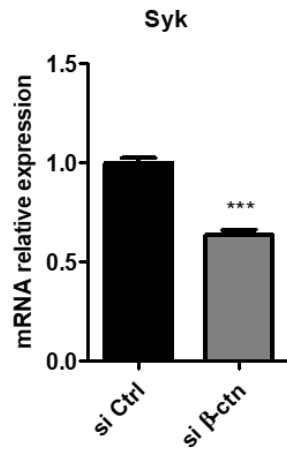
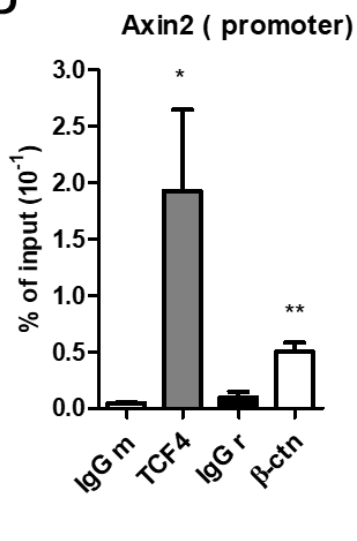
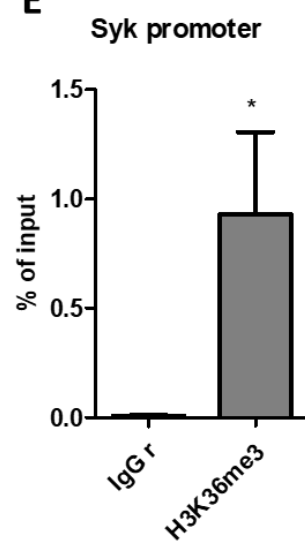
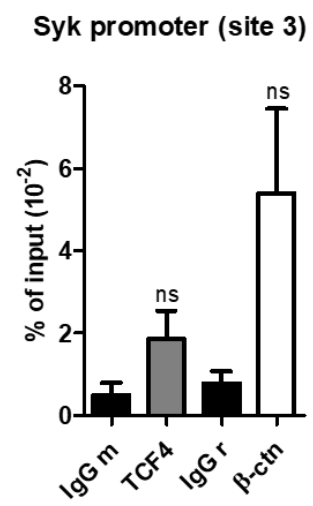


Supplemental 1



Supplemental 2

A**B****Supplemental 3****A****Supplemental 4**

A**B****C****D****E****F****Supplemental 5**

Considérations méthodologiques et résultats complémentaires

Nos travaux dans les cellules H358 (voir article) ont mis en évidence des liens fonctionnels entre Syk, la β -caténine et Vav1. Comme notre objectif principal était d'établir le différentiel de la signalisation impliquant ces protéines entre le système hématopoïétique et le système épithélial, nous avons initié un travail avec ce trio dans des cellules d'origine hématopoïétique. Nous avons choisi comme modèle d'étude les cellules de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC). La LLC est une hémopathie des lymphocytes B CD5+ caractérisée par l'accumulation de lymphocytes B matures dans le sang, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes secondaires. Affectant généralement le sujet âgé, la progression clinique de cette maladie est variable, certains patients présentent une forme indolente qui ne nécessite pas de traitement alors que d'autres ont une forme progressive qui requiert une thérapie. Parmi les traitements développés et actuels, certains ciblent la signalisation du BCR et permettent un ralentissement de la progression de la maladie. L'ibrutinib, inhibiteur de BTK, entraîne une chasse des cellules leucémiques des tissus lymphoïdes secondaires comme les ganglions vers la circulation périphérique (de Rooij et al., 2012).

Suite à l'activation du BCR par un antigène, un signalosome constitué de différentes protéines se met en place pour initier et amplifier le signal extracellulaire transmis. L'activité du signalosome est régulée par des équilibres entre les différents effecteurs de cette voie de signalisation. L'un des premiers effecteurs mis en jeu dans la transduction du signal du BCR est Syk qui est activée par phosphorylation par les Src kinases et par autophosphorylation et qui phosphoryle à son tour de nombreux substrats.

Syk figure parmi les effecteurs ciblés dans la LLC car elle est surexprimée dans les cellules leucémiques en absence de mutations (Buchner et al., 2010; Le Roy et al., 2012). Certains de ses partenaires tels que Lyn, BTK, PLC γ 2, BLNK, sont également dérégulés dans la LLC (Buchner et al., 2009; Wang et al., 2013). L'ensemble de ces surexpressions conduit à une potentialisation de la signalisation du BCR traduit par une augmentation de la survie des cellules B de LLC. Des travaux de notre équipe ont démontré plus finement que les niveaux d'expression protéique de l'IgM de surface, de Syk et/ou de Zap70 sont responsables de la survie des cellules leucémiques. (Le Roy et al., 2012). Par ailleurs, notre équipe a montré que la β -caténine est un effecteur à travers lequel la signalisation du BCR maintient la survie et la prolifération des cellules B du lymphome du manteau (LCM)(Lazarian et al., 2020b).

Pour établir notre début de comparaison, nous avons donc commencé à analyser le partenariat Syk / β -caténine dans une lignée cellulaire B leucémique.

1. Interaction entre Vav1, Syk et β -caténine dans les cellules B leucémiques.

Tout comme dans les cellules H358, nous avons souhaité mettre en évidence l'interaction possible entre Syk, β -caténine et Vav1 par co-immunoprécipitation dans une lignée cellulaire représentative de la LLC : la lignée Mec1. Cette lignée a été établie à partir de la

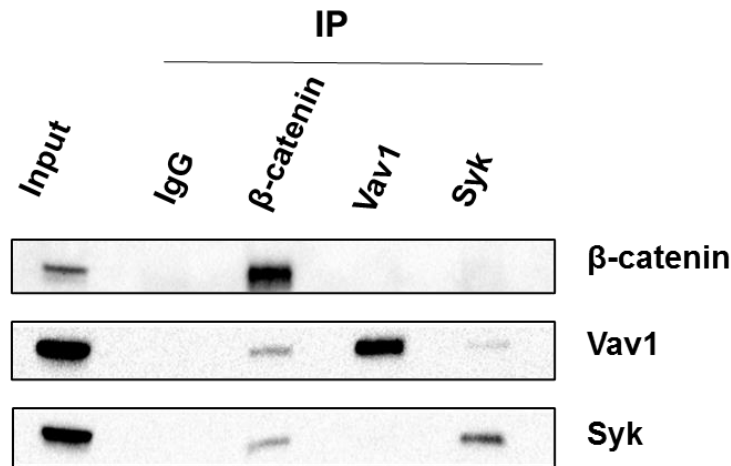


Figure 22: Co-IP entre Syk, β -caténine et Vav1 dans la lignée Mec1. Les différentes immunoprécipitations sont réalisées à partir d'un mg de protéines totales dans la lignée cellulaire Mec1 et sont révélées par Western blot avec les anticorps indiqués.

croissance spontanée de cellules LLC immortalisées par le virus Epstein-Barr (EBV) (Rasul et al., 2014; Stacchini et al., 1999).

Comme l'indique la figure 22, l'immunoprécipitation de la β -caténine montre un enrichissement considérable en β -caténine mais surtout des bandes associées correspondantes à Vav1 et Syk et absentes dans la condition contrôle IgG. Par ailleurs, on retrouve bien une co-immunoprécipitation de Vav1 avec Syk comme décrite précédemment dans la littérature (Deckert et al., 1996).

Ces résultats indiquent que Syk, β -caténine et Vav1 peuvent interagir dans un même complexe protéique et ce, dans des cellules B leucémiques. Pour autant, la co-immunoprécipitation ne permet pas d'affirmer que cette interaction ne fait pas intervenir d'autres partenaires même si des interactions directes entre Syk/ β -caténine et Vav1/ β -caténine ont été mis en évidence (Bhardwaj et al., 2018; Razanadrakoto et al., 2015b). Il est intéressant de noter que l'on détecte une interaction entre les trois partenaires en absence de stimulation, et tout particulièrement celle du BCR. Il existe donc un complexe contenant les trois partenaires à l'état basal dans cette lignée cellulaire et il serait utile de comparer ces interactions entre l'état activé et l'état basal du BCR.

Un de mes objectifs était la mise en évidence de ce complexe dans les cellules de patients atteints de LLC et sa régulation en fonction de l'activation du BCR, élément clé de cette

pathologie. Si l'on considère mes résultats obtenus dans les cellules H358, cette interaction dans les cellules B de LLC suggère la possibilité d'une régulation des modifications post-traductionnelles de la β -caténine par Syk. Nous souhaitons également analyser l'éventuelle régulation transcriptionnelle du gène Syk par la β -caténine.

Pour ces différents objectifs, nous avons décidé de générer des lignées cellulaires de cellules B exprimant stablement des shRNAs pour déplerer la β -caténine et Syk. Les stratégies et les résultats préliminaires sont présentés dans la partie ci-dessous.

2. Optimisation de l'extinction de la kinase Syk ou de la β -caténine par des lentivirus dans les lignées leucémiques Mec1 et HG3.

Pour obtenir des lignées stables exprimant des shRNAs dirigés contre les ARNm de Syk ou de β -caténine, nous avons produit et utilisé des lentivirus. Le protocole de production et d'infection des cellules Mec1 et HG3 est présenté à la fin de cette section.

Comme nous avons mis en évidence une co-immunoprécipitation entre les partenaires dans la lignée Mec1, nous avons souhaité générer ces cellules dépletées en Syk et en β -caténine. Après plusieurs essais d'infection, nous avons obtenu plusieurs lignées avec un niveau d'expression de Syk réduit d'environ 60% (Figure 23, panel A).

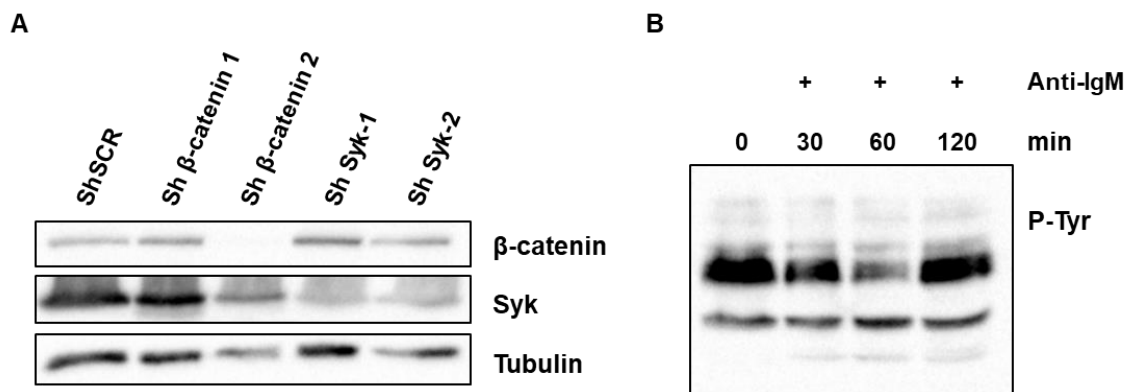


Figure 23: Mise au point de la déplétion de Syk et β -caténine dans les cellules Mec1. A. Déplétion de Syk et β -caténine par deux shARN dirigés contre deux régions différentes des deux protéines respectivement. B. Phosphorylation des tyrosines après stimulation du BCR par 20 μ L/ml de l'anti-IgM.

En revanche, nous avons obtenu des résultats différents avec les cellules résistantes à la puromycine et exprimant des shRNAs dirigés contre la β -caténine (Figure 23, panel A). Une seule déplétion majeure a été mise en évidence une fois au cours de tous nos essais, mais les cellules sont mortes très rapidement après la fin de la sélection. Après plusieurs tentatives

infructueuses, nous avons abandonné la lignée Mec1 estimant qu'elle n'était peut-être pas la plus appropriée.

De plus, nous avons observé que la stimulation du BCR des cellules Mec1 par un anti-IgM n'aboutit pas à l'augmentation significative de la phosphorylation globale des tyrosines mise en évidence par un anticorps anti-phospho-tyrosine (Figure 23, panel B). Ces expériences préliminaires nous ont permis de réaliser que cette lignée cellulaire n'est pas un modèle adapté pour étudier la signalisation du BCR dans la LLC probablement en raison de l'absence de l'expression de CD79a (Rasul et al., 2014).

Après ces difficultés rencontrées avec les cellules Mec1, nous avons décidé de changer de lignée cellulaire et de travailler avec la lignée HG3 (Quentmeier et al., 2019; Rosén et al., 2012). Nous avons utilisé avec ces cellules les mêmes lentivirus décrits précédemment avec quelques modifications dans notre protocole d'infection pour obtenir les lignées stables.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'efficacité des shRNAs dans les différentes lignées par Western-Blot et qRT-PCR. Le panel A de la figure 3 montre que le niveau d'expression de Syk est plus faible dans les deux lignées (shSyk-1 et shSyk-2) par rapport à la lignée contrôle (50% avec le shSyk-1 et de 60% avec le shSyk-2). Cette réduction au niveau protéique résulte bien de la diminution de la quantité d'ARNm de Syk (40% avec le shSyk-1 et de 45 % avec le shSyk-2) (Figure 24).

S'il a été possible d'obtenir des lignées avec deux shRNAs dirigés contre l'ARNm de Syk, l'obtention de lignées déplétées en β -caténine est restée inefficace comme pour les cellules Mec1. Au cours de nos expériences nous avons remarqué que le niveau d'expression de la β -caténine est très faible dans les cellules B primaires et lignées (HG3 et Mec1) par rapport aux cellules épithéliales. Il est possible qu'éteindre ce faible niveau d'expression dans ces cellules soit létal et que nous avons sélectionné des cellules qui ont trouvé le moyen de ne pas éteindre l'expression de la β -caténine. L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques et/ou des approches d'inhibition transitoire sont sans doute des stratégies plus appropriées pour l'étude de la β -caténine dans ces cellules.

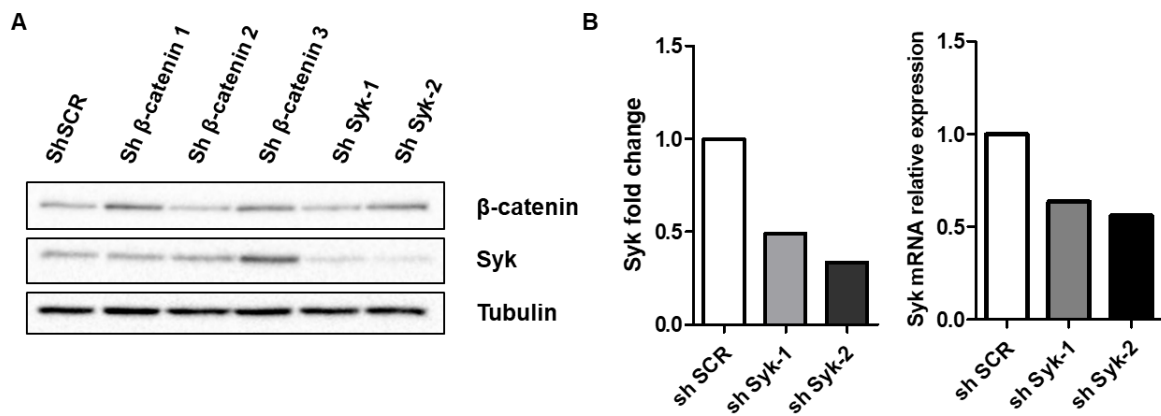


Figure 24: Déplétion de Syk et β -caténine dans la lignée HG3. A. Vérification par Western blot de la déplétion stable de β -caténine ou de Syk par différents shARN. B. Analyse de l'expression de Syk par Western blot et qRT-PCR.

Avec l'établissement de ces lignées stablement déplétées en Syk, nous avons juste pu débiter la caractérisation du rôle de Syk dans l'état de phosphorylation de la β -caténine et d'établir un lien fonctionnel entre les deux protéines.

3. Syk module la phosphorylation de la β -caténine sur la Y142 en aval du BCR.

Les modifications post-traductionnelles de la β -caténine sur ses différents résidus (Ser, Tyr, Thr ou Lys) sont essentielles à ses différentes fonctions ainsi qu'à sa localisation cellulaire. Nous avons montré que Syk est impliquée dans la phosphorylation de la Y142 de la β -caténine aussi bien dans les cellules H358 que HEK293T. Ces résultats sont en accord avec une étude publiée récemment qui montre que Syk est une des kinases responsables de la phosphorylation du résidu Y142 dans un modèle de glioblastome (Bhardwaj et al., 2018). Dans notre objectif principal de comparaison de cellules épithéliales et de cellules B, nous avons analysé la phosphorylation de la β -caténine en absence de Syk dans des cellules stimulées et non-stimulées (Figure 25).

Pour contrôler l'efficacité de la stimulation avec un anti IgM soluble, nous avons analysé l'intensification des phosphorylations de Akt et de PLC γ 2, deux effecteurs majeurs de la voie du BCR. L'activation de l'axe PLC γ 2/PKC/MEK/ERK qui active NFAT ou de l'axe PI3K/Akt contribue à la survie des cellules B. En effet, le résidu Y1217 de PLC γ 2 est phosphorylé directement par Syk ou Lyn en aval du BCR (Kim et al., 2004), alors que le résidu S473 de Akt est phosphorylé par la kinase mTORC2 (Sarbasov et al., 2005).

Après 15min de stimulation du BCR, nous observons bien une augmentation de la phosphorylation de Akt (résidu S473) et PLC γ 2 (résidu Y1217) aussi bien dans les cellules déplétées en Syk que dans les cellules contrôles. En revanche, la phosphorylation de PLC γ 2

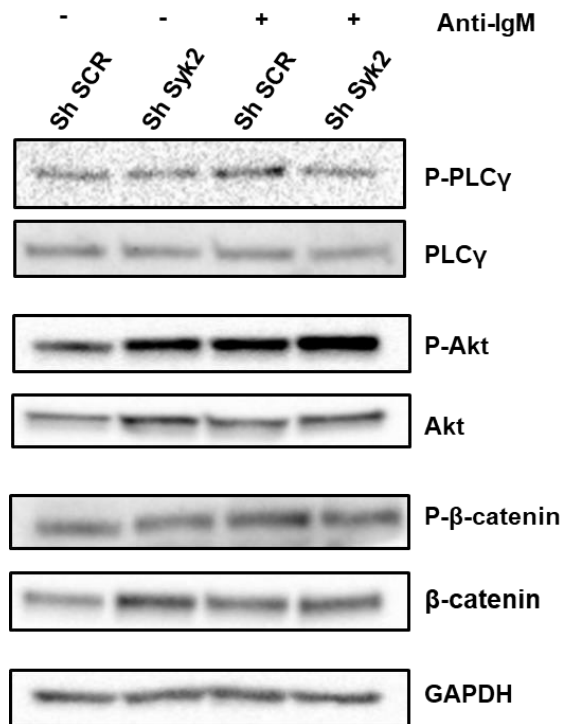


Figure 25: Modulation de la phosphorylation de la tyrosine 142 de la β -caténine par Syk suite à une stimulation antigénique. Analyse par Western Blot des niveaux de phosphorylation des protéines dans les cellules HG3 stimulées par 20 μ g/ml d'anti-IgM pendant 15min. Les anticorps sont indiqués sur la figure et la GAPDH est utilisé comme contrôle de la quantité de protéine.

dans les cellules dépourvues de Syk est significativement diminuée par rapport aux cellules contrôles.

Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de PLC γ 2 sur la Y1217 dépend de l'activation de Syk alors que la phosphorylation de Akt sur la S473 est indépendante de Syk ou bien l'absence de Syk est récompensée par une autre kinase alternative qui pourrait activer la voie de PI3K.

Concernant la β -caténine, on retrouve une faible stabilisation au bout de 15 min de stimulation dans les cellules contrôles. De plus, nous avons observé que cette stabilisation est maintenue en absence de Syk suite à la stimulation ou non des cellules. Montrant que Syk pourrait avoir un rôle de régulateur négative sur la stabilisation de la β -caténine indépendamment de l'activation de BCR. Cependant, la stimulation antigénique des cellules contrôles aboutit à une augmentation importante de la phosphorylation de la β -caténine sur son résidu Y142 à l'inverse de la stimulation des cellules déplétées en Syk. Ces résultats indiquent donc que la tyrosine

kinase Syk est nécessaire à la phosphorylation de la β -caténine sur le résidu Y142 en aval du BCR dans les cellules B et de même que les cellules épithéliales Syk serait la kinase responsable de cette phosphorylation.

L'ensemble de ces résultats montre un lien entre la β -caténine et Syk en aval de la signalisation du BCR dans les cellules B de LLC et suggère l'existence d'une inter-régulation entre les deux protéines et qui nécessite une étude plus approfondie.

4. Matériels et méthodes utilisés dans l'étude complémentaire

Culture cellulaire

Les lignées cellulaire Mec1 et HG-3 proviennent des patients atteints de leucémie à cellules B chronique (LLC). Les cellules sont cultivées respectivement dans le milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) et RPMI 1640 complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de glutamine et 1% de pénicilline et de streptomycine (PAA). Les lignées cellulaires sont maintenues en culture en atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂.

La stimulation des cellules par des anti-IgM solubles

Les cellules sont mises en culture dans une plaque de 24 puits. La solution d'anti-IgM Fab'2 (Affinitipure Fab'2 fragment Donkey anti-human IgM Fc 5u Fragment spécifique minimal) est directement ajoutée dans les puits contenant les cellules HG3 (20 μ g/ml). La plaque est ensuite incubée à 37°C et à 5% de CO₂.

Transfection et production de lentivirus

La production de virus et l'infection des lignées MEC1 et HG-3 s'est déroulé selon le protocole suivant. L'agent de transfection Trans-IT (Mirus) a été utilisé pour transfecter les cellules 293T par les différentes constructions plasmidiques (shSCR pLKO.1, sh Syk pLKO.1 ou sh β -caténine pLKO.1 cotransfecté avec pCMV Δ R8.2 et pCMV-VSV-G (ratio 8 :1)) pour permettre la génération de particules virales. Les virus ont été collectés 48 heures après la transfection dans le surnageant des cellules 293T. Les surnageants contenant les particules virales ont été centrifugés avec 6x10⁶ cellules HG-3 par condition pendant 90 min à 2400 rpm en présence de 6 μ g/ml de polybrène. Les cellules ainsi infectées sont ensuite mises en culture pendant 24h puis sélectionnées avec 2 μ g/ml de puromycine.

Co- immunoprécipitation avec des billes magnétiques

L'immunoprécipitation est réalisée à partir 1mg de protéines. Le lysat est incubé avec des billes magnétiques (Pure ProteomeTM Protein A and Protein G magnetic Beads, Millipore) pendant 1H à 4°C (Etape de Pre-Clear). D'autre part, les anticorps (4 μ g) sont couplés aux billes magnétiques pendant 1H à température ambiante. Après centrifugation, les extraits sont

transférés dans de nouveaux tubes puis incubés avec les billes magnétiques couplés aux anticorps à 4°C toute la nuit. Les billes sont ensuite lavées 3* fois dans du tampon de lyse puis les protéines sont dénaturées (10 minutes à 90°C) dans du Laemmli 2X (0.5 Tris-HCl pH 6.8, glycérol, 20% SDS, 1% bleu de bromophénol et 10% DTT). La révélation des protéines immunoprécipitées s'effectue par Western Blot.

Western blot

Les cellules sont lysées dans un tampon contenant 50mM Tris-HCL pH 7,4, 1% NP40, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 1mM DTT et des inhibiteurs de protéases (1µg/ml pepstatine, 1mM PMSF, 1µg/ml leupeptine et 1µg/ml d'aprotinine). Les concentrations en protéines sont déterminées avec le kit de dosage Pierce TM BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

Après dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, les échantillons sont migrés à 150 volts sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 8% dans un tampon TG-SDS (Euromedex). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C-super, Amersham) pendant 1h15 dans un tampon de transfert TG (Tri-Glycine) (TG et 20% éthanol) à 100 volts. Après transfert, la membrane est saturée dans du lait ou de l'albumine de sérum bovin dilués à 5% dans du TBST-Tween 0.2% pendant 30 minutes à température ambiante.

La membrane est ensuite hybridée avec les différents anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages dans du TBST-Tween 0.2%, la membrane est ensuite incubée pendant 45 minutes en présence d'anticorps secondaire couplé à l'HRP (Horse Radish Peroxidase, Biorad) dilué au 1/10000ème dans du lait 5% TBS-Tween 0.2%. Après plusieurs lavages, les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence (clarify, Biorad) et les images sont acquises avec le Chemidoc (Biorad).

RT-PCR quantitative

Les ARN cellulaires totaux sont isolés en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen). Après dosage, des ADNc sont générés à partir d'1µg d'ARN en utilisant le kit iScript™ cDNA Synthesis (Biorad). La rétro-transcription est réalisée dans un Thermocycler selon le programme suivant : 25°C pendant 5 minutes, 42°C pour 30 minutes et 85°C pour 5 minutes.

Les PCR quantitatives sont réalisées avec le PowerUp™ SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Life technologies) avec les ADNcdilués au 1/10^{ème} et les amorces spécifiques à 3µM. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 95°C pendant 10 minutes, 40 cycles de dénaturation pendant 15 secondes à 95°C et d'hybridation/élongation pendant 1 minute à 60°C dans un appareil de type Step One Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Life Technologies).

Discussion et perspectives

L'objectif initial de ma thèse était de caractériser l'interaction entre trois protéines Vav1, Syk et la β -caténine dans des cellules épithéliales pour mieux comprendre l'impact de l'expression ectopique de Vav1 et de ses partenaires et ainsi le comparer au rôle exercé dans le système hématopoïétique. Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé la lignée cellulaire de carcinome pulmonaire H358 puis les lignées cellulaires leucémiques HG3 et Mec1. Nous avons pu montrer que Vav1, Syk et la β -caténine interagissent dans les différentes lignées et nous avons mis en évidence entre les trois partenaires des liens de régulation qui ouvrent de nouvelles perspectives.

1. Le trio Vav1, Syk et β -caténine : similitudes et différences entre cellules épithéliales et hématopoïétiques.

Dans un premier temps, nous avons observé la co-expression de Vav1 et Syk dans des lignées de carcinomes pulmonaires. Parmi ces lignées se trouve la lignée H358 dans laquelle nous avons montré l'interaction entre Vav1 et la β -caténine (Razanadrakoto et al., 2015a) et nous avons ensuite mis en évidence une interaction entre Syk et Vav1 ; partenariat clé identifié préalablement dans les cellules hématopoïétiques (Deckert et al., 1996). Si une interaction est retrouvée dans les deux types cellulaires, le mode d'action semble différer. Nos données montrent que Syk ne phosphoryle pas que la tyrosine régulatrice Y174 de Vav1 comme dans le système hématopoïétique (Deckert et al., 1996). Si l'on analyse la phosphorylation globale des tyrosines de Vav1, la déplétion de Syk ou son inhibition pharmacologique indiquent bien que Syk phosphoryle d'autres résidus que la Y174. Des analyses bio-informatiques préliminaires sur le site Phosphonet (<http://www.phosphonet.ca>) prédisent que Syk pourrait phosphoryler Vav1 sur les tyrosines régulatrices Y142 et Y160 dans le domaine AC, les résidus Y604 et Y836 dans les domaines SH3 et le résidu Y844 dans le domaine SH3 C-terminal. Les résidus Y142, Y160 constituent avec la Y174 le trio des tyrosines régulatrices historiques de l'activité GEF et la Y836, via le domaine C-SH3, contribue à la régulation de l'activité de Vav1 (Barreira et al., 2014; López-Lago et al., 2000). A l'inverse, le(s) rôle(s) des résidus Y604 et Y844 n'ont jamais été étudiés. Il serait donc intéressant d'analyser, en utilisant des mutants, la phosphorylation potentielle de ces tyrosines par Syk aussi bien dans des cellules épithéliales qu'hématopoïétiques. Cette approche renforcerait notre hypothèse que l'activation de Vav1 par Syk peut différer en fonction de son expression tissulaire et renseignerait sur les mécanismes

d'activation de cette protéine adaptatrice. Nos données suggèrent donc que la relation entre Syk et Vav1 est plus complexe que ce que l'on estimait jusqu'à présent et les perspectives proposées pourraient éclaircir les connexions entre les deux protéines.

Parallèlement, comme nous avons identifié la β -caténine comme nouveau partenaire de Vav1, nous nous sommes naturellement interrogés sur une éventuelle interaction entre Syk et la β -caténine. Comme pour Vav1 précédemment, nous avons pu montrer que Syk et la β -caténine co-immunoprécipitent montrant l'existence d'un trio Vav1-Syk- β -caténine dans les lignées étudiées. La caractérisation des domaines d'interaction entre les différents partenaires et la clarification de l'importance de Vav1 dans cette interaction sont dignes d'intérêt. Il a d'ailleurs été montré par l'équipe du Dr Judit Herreros et grâce à l'utilisation de protéines purifiées que Syk et la β -caténine interagissent indépendamment de la présence d'autres protéines (Bhardwaj et al., 2018). Pour autant, Vav1 pourrait faciliter cette interaction. L'utilisation de formes tronquées des protéines, sous réserve que la conformation soit respectée, dans des cellules dépourvues de Vav1 et de Syk permettrait de répondre à cette question fondamentale et de nous renseigner sur la formation/stabilisation du complexe.

Pour caractériser fonctionnellement cette interaction, nous avons étudié l'impact de la déplétion de Syk et de Vav1 sur les modifications post-traductionnelles de la β -caténine dans la lignée H358. Parmi les modifications analysées, la phosphorylation de la Y142 est sans doute une des plus intéressantes en relation avec Syk et Vav1. Son implication a été montrée à la fois dans la déstabilisation des jonctions d'adhérence par une diminution de la liaison β -caténine/ α -caténine mais aussi dans la transcription (Brembeck et al., 2006; Weng et al., 2019). Dans nos expériences, la déplétion de Vav1 et/ou de Syk ainsi que l'inhibition pharmacologique de Syk entraînent une diminution de la phosphorylation de la Y142. Comme Syk est une tyrosine kinase, il était plausible de lui attribuer la phosphorylation de la Y142. Au cours de ce travail, une autre équipe a d'ailleurs montré que Syk phosphoryle bien ce résidu en lien avec la division cellulaire des astrocytes (Bhardwaj et al., 2018). Pour confirmer nos résultats, nous avons surexprimé la forme sauvage de Syk, une forme mutée abolissant son activité kinase et la forme sauvage de Vav1 dans les cellules HEK293T. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que la phosphorylation de la Y142 est bien induite par Syk et qu'étonnamment la présence de Vav1 potentialise cette dernière. Vav1, en tant que protéine adaptatrice pourrait faciliter le rapprochement entre Syk et la β -caténine. D'autre part, une étude dans des cellules de cancer du sein montre que Syk peut phosphoryler également la β -caténine sur le résidu Y30 et que cette modification participe au maintien de l'intégrité des jonctions épithéliales (Kassouf et al., 2019).

De ce fait, la phosphorylation de la β -caténine par Syk apparait plus complexe et pourrait impliquer plusieurs résidus tyrosines. Par défaut d'anticorps, il serait intéressant d'analyser par spectrométrie de masse la phosphorylation de l'ensemble des tyrosines de la β -caténine susceptibles d'être phosphorylées par Syk. Une telle analyse permettrait une meilleure caractérisation de l'interaction d'une part entre ces deux protéines et d'autre part les conséquences sur l'activation des différentes voies de signalisation engendrées par cette interaction.

Comme notre objectif était de comparer le trio dans des cellules épithéliales et hématopoïétiques, nous avons vérifié l'interaction entre les trois protéines dans des cellules B. Comme dans les cellules épithéliales, les trois protéines co-immunoprécipitent dans des lignées B. Nous avons aussi généré des lignées de cellules B (HG3) déplétées pour Syk afin d'étudier plus finement le lien entre les protéines. Nous avons observé que la stimulation antigénique du BCR induit la stabilisation de la β -caténine dans les cellules B. Cette stabilisation a d'ailleurs aussi été montrée récemment dans les cellules de lymphome du manteau (Lazarian et al., 2020a). Nous avons également observé que la déplétion de Syk induit la diminution de la phosphorylation de la Y142 suite à la stimulation antigénique. Ces données préliminaires suggèrent que Syk peut phosphoryler la β -caténine sur la Y142 dans les cellules B à l'image des cellules épithéliales. Néanmoins, ces résultats sont à confirmer par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de Syk (notamment le R406). Il est maintenant nécessaire de comprendre les conséquences fonctionnelles de cette phosphorylation notamment s'il y a des modifications de la localisation de la β -caténine, de son interaction avec différents facteurs de transcription et par conséquent de son activité transcriptionnelle.

Si un lien avec la voie de signalisation initiée par le BCR semble acquis même s'il reste à le caractériser plus finement, il est possible que la modification de la β -caténine par Syk soit déclenchée par d'autres récepteurs membranaires. En effet, Syk participe à la polarité et à la migration des cellules B en réponse à la stimulation des récepteurs CXCR4 par la chimiokine CXCL12 (Matsusaka et al., 2005). L'accumulation nucléaire de la β -caténine est induite par l'activation du récepteur CXCR4 dans des cellules épithéliales même si cette cascade de signalisation et les effecteurs ne sont pas encore bien caractérisés (Song et al., 2015; Tang et al., 2019; Wang and Ma, 2007). La β -caténine, comme le CXCR4, est impliquée dans la migration des cellules B (de Gorter et al., 2007; Janovská and Bryja, 2017; Montresor et al., 2018) mais il n'a jamais été démontré que l'activation de la voie CXCR4 pourrait aboutir à l'accumulation de la β -caténine. Syk pourrait être un lien commun, dans les cellules épithéliales et hématopoïétiques, entre le récepteur CXCR4 et la stabilisation de la β -caténine suggérant

l'existence d'un axe CXCR4-Syk- β -caténine qui participerait à l'adhérence et à la migration cellulaire.

2. La régulation transcriptionnelle de Syk (et stabilisation ?) par la β -caténine

La littérature est riche sur la dualité fonctionnelle de Syk dans les cancers : Syk peut jouer le rôle d'oncogène ou de suppresseur de tumeur en fonction du type de cancer (Krisenko and Geahlen, 2015). L'ensemble de ces études repose principalement sur l'analyse des fonctions de la protéine (activité kinase, partenaires, voie de signalisation) et non pas sur la régulation de sa transcription. Nous pouvons aujourd'hui apporter notre contribution à la compréhension de la régulation transcriptionnelle de Syk. Mon travail de thèse montre que Syk est un gène cible de la β -caténine. En effet, nous avons observé une diminution de l'expression de l'ARNm de Syk dans les cellules H358 déplétées en β -caténine. Cette régulation est permise par la fixation de la β -caténine et de l'un de ses cofacteurs, le facteur de transcription TCF4, sur deux sites présents dans le promoteur de Syk. Néanmoins, la β -caténine pourrait réguler l'expression de Syk via d'autres cofacteurs de transcription comme FOXO, NF- κ B ou encore HIF1 α (Bouaziz et al., 2016; Essers et al., 2005; Lazarian et al., 2020a; Valenta et al., 2012) car le promoteur de Syk contient des sites potentiels de fixation de ces facteurs de transcription (<https://epd.epfl.ch>). Les dérégulations de l'expression de Syk observées dans les cancers sont majoritairement liées à une régulation épigénétique (hyperméthylation) de son promoteur (Ma et al., 2010; Shin et al., 2014; Wang et al., 2004) et très peu d'études abordent cette régulation par l'analyse de facteurs de transcription (Gao et al., 2018; Oda et al., 2018). Un examen plus détaillé de la régulation du promoteur aussi bien dans les cellules épithéliales qu'hématopoïétiques permettra de mieux comprendre la régulation de l'expression tissu-spécifique.

Au cours de ce travail, nous avons observé que la déplétion de la β -caténine, dans des cellules dépourvues de Syk, altère aussi la détection de la protéine Syk exprimée à partir d'un plasmide exogène ; l'hypothèse que l'on peut émettre sur la base de ce résultat est que l'absence de β -caténine aurait également un impact sur la stabilité de Syk. En effet, l'inhibition observée n'est alors pas reliée à l'activité transcriptionnelle de la β -caténine sur le promoteur de Syk. Nous n'avons cependant pas pu vérifier cette hypothèse par manque de temps. Parmi les systèmes de dégradation, le protéasome représente la principale voie de protéolyse cellulaire (Zheng and Shabek, 2017) et de régulation de la stabilité de Syk (Rao et al., 2002). Parmi les

protéines assurant plusieurs fonctions cellulaires, le facteur de transcription OCA-B est important pour la différenciation des cellules B et il a la capacité d'interagir avec Syk. Non seulement OCA-B peut réguler les premiers événements de la signalisation intracellulaire par interaction directe avec Syk, mais il peut aussi fonctionner classiquement comme un facteur de transcription (Siegel et al., 2006). Dans des modèles murins, cette association est d'ailleurs marquée par l'inhibition de la phosphorylation sur la Y317 (Y323 chez l'Homme) ce qui entraîne une stabilisation de Syk. En effet, la phosphorylation de ce résidu par la Src-kinase Lyn entraîne le recrutement de c-cbl qui à son tour provoque la dégradation de Syk par le protéasome (Sada et al., 2000). En résumé, l'interaction du facteur de transcription OCA-B avec Syk induit une altération de sa phosphorylation et la stabilisation de la kinase en inhibant sa dégradation par le protéasome. Ces observations nous permettent d'envisager un mécanisme similaire dans la régulation de la stabilité de la protéine Syk par la β -caténine dans les cellules B illustrant une régulation aussi bien au niveau protéique que transcriptionnel.

3. Vav1, Syk et β -caténine : un complexe cytoplasmique et/ou nucléaire ?

Suite à l'identification du complexe Syk-Vav1- β -caténine dans notre système cellulaire, nous avons étudié certaines fonctions cytoplasmiques de ce dernier. Nous avons pu montrer l'implication de ce complexe dans la régulation de l'activation des petites GTPases qui contrôle la migration cellulaire, la modulation des modifications post-traductionnelles de la β -caténine dans les cellules épithéliales mais également en aval de la signalisation du BCR dans les cellules hématopoïétiques. L'ensemble de nos données illustre principalement des fonctions cytoplasmiques de ce complexe. Pour autant, on ne peut pas exclure que ce complexe ait également une implication dans des fonctions nucléaires. L'implication de la signalisation passant par Vav1, Syk et β -caténine dans l'expression des gènes a été décrite dans plusieurs modèles pathologiques (Fernandez-Zapico et al., 2005; Sun et al., 2017). A l'inverse de Syk et Vav1, l'activité transcriptionnelle de la β -caténine a été bien inventoriée (Anthony et al., 2020; Valenta et al., 2012). Néanmoins, plusieurs études montrent que Vav1 et Syk interagissent également avec des protéines nucléaires et participent à des complexes transcriptionnels (Bertagnolo et al., 2011; Houlard et al., 2002; Wang et al., 2003). L'implication de Vav1 dans la régulation de la transcription a été démontrée pour la première fois dans des cellules hématopoïétiques. Dans ce système Vav1 est retrouvé dans un complexe transcriptionnel actif comprenant NFAT et NF- κ B (Houlard et al., 2002). Récemment, une étude a montré que Syk interagit avec le facteur de transcription YY1 et régule négativement l'expression de SNAI2

dans des cellules épithéliales (Gao et al., 2018). Ces données confirment et démontrent non seulement le rôle de cofacteur de transcription de la β -caténine mais également de Syk et Vav1. Nos résultats et l'ensemble de ces arguments nous permettent donc de suggérer que le complexe protéique Syk-Vav1- β -caténine jouerait un rôle clé dans la régulation de l'expression de certains gènes dans les deux systèmes cellulaires même si ceux-ci restent à identifier. Pour tenter de mettre en évidence une co-régulation tripartite ou bipartite, l'utilisation de l'immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage (ChIP-Seq) pourrait être envisagée pour déterminer l'ensemble des promoteurs reconnus par le trio ou les duos.

Bien que nous n'ayons pas détecté de modification significative de la translocation nucléaire, nous pouvons également discuter de l'implication du complexe Syk-Vav1- β -caténine dans d'autres fonctions nucléaires. Il a été proposé que la forme activée de Rac1 contrôle la translocation nucléaire de la β -caténine (Wu et al., 2008) et que cette même forme favorise l'interaction entre TCF/Lef et la β -caténine (Cavazza and Vernos, 2015; Fagotto, 2013; Jamieson et al., 2015). Nous proposons que le complexe Syk/Vav1 puisse activer Rac1 au niveau de la membrane plasmique et permette le passage d'un pool de β -caténine dans le noyau et ce de manière associée à Rac1 dans certains types cellulaires. Bien que ces mécanismes de translocation soient complexes à mettre en évidence, il serait intéressant de mieux comprendre comment ces trois protéines transitent d'un compartiment cellulaire à un autre.

4. Le complexe Syk-Vav1- β -caténine : importance pour la tumorigénèse ?

Nous avons montré une implication de Vav1, de Syk et de la β -caténine dans la régulation de la migration mais également de l'invasion des cellules H358 via l'activation spécifique des petites GTPases Rac1 et Cdc42. Nos résultats sont d'ailleurs similaires à ceux obtenus dans des cellules de cancer du pancréas où l'expression ectopique de Vav1 favorise la migration et l'invasion via l'activation des GTPases Rac1 et cdc42 (Razidlo et al., 2015). Ces fonctions de Vav1 ont été précédemment décrites par plusieurs équipes et dans plusieurs modèles (Katzav, 2015). De même, Syk peut favoriser la migration des kératinocytes (Fotheringham et al., 2012) et sa surexpression dans les cellules du carcinome squameux SIHN011 augmente la migration associée à l'activation de PLC γ 1 (Luangdilok et al., 2007). Cependant, un rôle opposé de Syk a aussi été révélé dans plusieurs études. Le rôle suppresseur de tumeur a été mis en évidence historiquement dans les cellules de cancers de sein (Coopman et al., 2000). Plus précisément, Syk contribuerait au maintien de l'intégrité épithéliale des

glandes mammaires via la phosphorylation des protéines des jonctions cellulaires telles que : p120-caténine, β -caténine, E-cadhérine. La déplétion de Syk dans les cellules de carcinome mammaire favorise la migration des cellules cancéreuses et son absence dans des glandes mammaires de souris altère la stabilisation des jonctions cellulaires en perturbant le complexe E-cadhérine/Caténine (Kassouf et al., 2019). Dans le mélanome, Syk induirait un arrêt du cycle cellulaire et inhiberait l'acquisition d'un phénotype migratoire et invasif associé à la formation de métastase (Bailet et al., 2009; Emilien, 2016). Si la dualité de Syk est établie, la question pour Vav1 continue de se poser. Une des manières d'y répondre serait d'évaluer les rôles de ce partenariat dans des cellules de mélanomes qui expriment Vav1 (Bartolomé et al., 2006).

L'importance de la β -caténine, notamment au sein de la voie Wnt, est décrite dans la progression tumorale de nombreux cancers (Galluzzi et al., 2019; Martin-Orozco et al., 2019). Pour autant, toutes les modalités, Wnt-dépendantes ou Wnt-indépendantes, de sa contribution au phénotype cancéreux ne sont pas encore totalement caractérisées. Notre hypothèse est que le trio Vav1-Syk- β -caténine participe au phénotype tumoral, que ses fonctions peuvent être dépendantes du tissu et de la localisation du complexe et qu'elles ne peuvent être résumées à des effets pro-tumoraux. En effet, on ne peut négliger la dualité de Vav1 et de Syk et il reste à déterminer plus finement l'impact de ces deux acteurs sur la tumorigénèse.

En conclusion générale, l'originalité de notre travail porte sur la caractérisation du trio Vav1-Syk- β -caténine dans un modèle de cancer d'origine épithéliale et dans un modèle d'hémopathies. Il illustre la complexité et la dualité des fonctions de certaines protéines. Ces données ouvrent de nombreuses perspectives pour permettre de déterminer plus finement les fonctions de ce trio dans les pathologies cancéreuses pour mieux les définir comme cibles thérapeutiques potentielles.

Bibliographie

- Abate, F., da Silva-Almeida, A.C., Zairis, S., Robles-Valero, J., Couronne, L., Khiabani, H., Quinn, S.A., Kim, M.Y., Laginestra, M.A., Kim, C., *et al.* (2017). Activating mutations and translocations in the guanine exchange factor VAV1 in peripheral T-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 764-769.
- Abudula, A., Grabbe, A., Brechmann, M., Polaschegg, C., Herrmann, N., Goldbeck, I., Dittmann, K., and Wienands, J. (2007). SLP-65 signal transduction requires Src homology 2 domain-mediated membrane anchoring and a kinase-independent adaptor function of Syk. *J Biol Chem* *282*, 29059-29066.
- Aghazadeh, B., Lowry, W.E., Huang, X.Y., and Rosen, M.K. (2000). Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* *102*, 625-633.
- Anthony, C.C., Robbins, D.J., Ahmed, Y., and Lee, E. (2020). Nuclear Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling: It's a Complex Situation. *Genes (Basel)* *11*.
- Archbold, H.C., Yang, Y.X., Chen, L., and Cadigan, K.M. (2012). How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway. *Acta Physiol (Oxf)* *204*, 74-109.
- Bahmanyar, S., Kaplan, D.D., Deluca, J.G., Giddings, T.H., O'Toole, E.T., Winey, M., Salmon, E.D., Casey, P.J., Nelson, W.J., and Barth, A.I. (2008). beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. *Genes Dev* *22*, 91-105.
- Baillet, O., Fenouille, N., Abbe, P., Robert, G., Rocchi, S., Gonthier, N., Denoyelle, C., Ticchioni, M., Ortonne, J.P., Ballotti, R., *et al.* (2009). Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest. *Cancer Res* *69*, 2748-2756.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* *449*, 1003-1007.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* *132*, 3151-3161.
- Barreira, M., Fabbiano, S., Couceiro, J.R., Torreira, E., Martínez-Torrecedrada, J.L., Montoya, G., Llorca, O., and Bustelo, X.R. (2014). The C-terminal SH3 domain contributes to the intramolecular inhibition of Vav family proteins. *Sci Signal* *7*, ra35.
- Barreira, M., Rodríguez-Fdez, S., and Bustelo, X.R. (2018). New insights into the Vav1 activation cycle in lymphocytes. *Cell Signal* *45*, 132-144.
- Bartolomé, R.A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sánchez-Mateos, P., Bustelo, X.R., and Teixidó, J. (2006). Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res* *66*, 248-258.
- Basu, S., Cheriyaundath, S., and Ben-Ze'ev, A. (2018). Cell-cell adhesion: linking Wnt/ β -catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis. *F1000Res* *7*.
- Behrens, J. (2000). Control of beta-catenin signaling in tumor development. *Ann N Y Acad Sci* *910*, 21-33; discussion 33-25.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* *382*, 638-642.
- Bek, S., and Kemler, R. (2002). Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability. *J Cell Sci* *115*, 4743-4753.
- Benjamin, J.M., Kwiatkowski, A.V., Yang, C., Korobova, F., Pokutta, S., Svitkina, T., Weis, W.I., and Nelson, W.J. (2010). AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* *189*, 339-352.

Bertagnolo, V., Grassilli, S., D'Aguzzo, S., Brugnoli, F., Bavelloni, A., Faenza, I., Nika, E., Urbani, A., Cocco, L., and Capitani, S. (2010). Mass spectrometry-based identification of Y745 of Vav1 as a tyrosine residue crucial in maturation of acute promyelocytic leukemia-derived cells. *J Proteome Res* 9, 752-760.

Bertagnolo, V., Grassilli, S., Petretto, A., Lambertini, E., Astatici, L., Bruschi, M., Brugnoli, F., Nika, E., Candiano, G., Piva, R., *et al.* (2011). Nuclear proteome analysis reveals a role of Vav1 in modulating RNA processing during maturation of tumoral promyelocytes. *J Proteomics* 75, 398-409.

Berton, G., Mócsai, A., and Lowell, C.A. (2005). Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol* 26, 208-214.

Betz, R., Sandhoff, K., Fischer, K.D., and van Echten-Deckert, G. (2003). Detection and identification of Vav1 protein in primary cultured murine cerebellar neurons and in neuroblastoma cells (SH-SY5Y and Neuro-2a). *Neurosci Lett* 339, 37-40.

Bhardwaj, D., Náger, M., Visa, A., Sallán, M.C., Coopman, P.J., Cantí, C., and Herreros, J. (2018). Phosphorylated Tyr142 β -catenin localizes to centrosomes and is regulated by Syk. *J Cell Biochem* 119, 3632-3640.

Blache, P., van de Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J.N., Clevers, H., and Jay, P. (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 166, 37-47.

Black, M., Ghasemi, F., Sun, R.X., Stecho, W., Datti, A., Meens, J., Pinto, N., Ruicci, K.M., Khan, M.I., Han, M.W., *et al.* (2020). Spleen tyrosine kinase expression is correlated with human papillomavirus in head and neck cancer. *Oral Oncol* 101, 104529.

Blancato, J., Graves, A., Rashidi, B., Moroni, M., Tchobe, L., Ozdemirli, M., Kallakury, B., Makambi, K.H., Marian, C., and Mueller, S.C. (2014). SYK allelic loss and the role of Syk-regulated genes in breast cancer survival. *PLoS One* 9, e87610.

Boddicker, R.L., Razidlo, G.L., Dasari, S., Zeng, Y., Hu, G., Knudson, R.A., Greipp, P.T., Davila, J.I., Johnson, S.H., Porcher, J.C., *et al.* (2016). Integrated mate-pair and RNA sequencing identifies novel, targetable gene fusions in peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 128, 1234-1245.

Bohnenberger, H., Oellerich, T., Engelke, M., Hsiao, H.H., Urlaub, H., and Wienands, J. (2011). Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells. *Eur J Immunol* 41, 1550-1562.

Boon, E.M., van der Neut, R., van de Wetering, M., Clevers, H., and Pals, S.T. (2002). Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res* 62, 5126-5128.

Bouaziz, W., Sigaux, J., Modrowski, D., Devignes, C.S., Funck-Brentano, T., Richette, P., Ea, H.K., Provot, S., Cohen-Solal, M., and Haÿ, E. (2016). Interaction of HIF1 α and β -catenin inhibits matrix metalloproteinase 13 expression and prevents cartilage damage in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5453-5458.

Bourroul, G.M., Fragoso, H.J., Gomes, J.W., Bourroul, V.S., Oshima, C.T., Gomes, T.S., Saba, G.T., Palma, R.T., and Waisberg, J. (2016). The destruction complex of beta-catenin in colorectal carcinoma and colonic adenoma. *Einstein (Sao Paulo)* 14, 135-142.

Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (1999). β -catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155, 1033-1038.

Brdicka, T., Kadlecik, T.A., Roose, J.P., Pastuszak, A.W., and Weiss, A. (2005). Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 25, 4924-4933.

Brembeck, F.H., Rosário, M., and Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 16, 51-59.

Brembeck, F.H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., and Birchmeier, W. (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18, 2225-2230.

Buchner, M., Baer, C., Prinz, G., Dierks, C., Burger, M., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Jumaa, H., Veelken, H., and Zirlik, K. (2010). Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115, 4497-4506.

Buchner, M., Fuchs, S., Prinz, G., Pfeifer, D., Bartholomé, K., Burger, M., Chevalier, N., Vallat, L., Timmer, J., Gribben, J.G., *et al.* (2009). Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 69, 5424-5432.

Bustelo, X.R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* 20, 1461-1477.

Bustelo, X.R. (2014). Vav family exchange factors: an integrated regulatory and functional view. *Small GTPases* 5, 9.

Bustelo, X.R. (2018). RHO GTPases in cancer: known facts, open questions, and therapeutic challenges. *Biochem Soc Trans* 46, 741-760.

Bustelo, X.R., Lorenzo-Martín, L.F., Cuadrado, M., Fernández-Pisonero, I., and Robles-Valero, J. (2018). An unexpected tumor suppressor role for VAV1. *Mol Cell Oncol* 5, e1432257.

Bustos, V.H., Ferrarese, A., Venerando, A., Marin, O., Allende, J.E., and Pinna, L.A. (2006). The first armadillo repeat is involved in the recognition and regulation of beta-catenin phosphorylation by protein kinase CK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19725-19730.

Campbell, J.D., Alexandrov, A., Kim, J., Wala, J., Berger, A.H., Pedamallu, C.S., Shukla, S.A., Guo, G., Brooks, A.N., Murray, B.A., *et al.* (2016). Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 48, 607-616.

Cannon, A.C., Uribe-Alvarez, C., and Chernoff, J. (2020). RAC1 as a Therapeutic Target in Malignant Melanoma. *Trends Cancer* 6, 478-488.

Cao, Y., Janssen, E.M., Duncan, A.W., Altman, A., Billadeau, D.D., and Abraham, R.T. (2002). Pleiotropic defects in TCR signaling in a Vav-1-null Jurkat T-cell line. *EMBO J* 21, 4809-4819.

Carsetti, L., Laurenti, L., Gobessi, S., Longo, P.G., Leone, G., and Efremov, D.G. (2009). Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation. *Cell Signal* 21, 1187-1194.

Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., and Bejsovec, A. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604-608.

Cavazza, T., and Vernos, I. (2015). The RanGTP Pathway: From Nucleo-Cytoplasmic Transport to Spindle Assembly and Beyond. *Front Cell Dev Biol* 3, 82.

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2015). How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov* 5, 22-24.

Chen, L., Huynh, L., Apgar, J., Tang, L., Rassenti, L., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2008a). ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111, 2685-2692.

Chen, L., Monti, S., Juszczynski, P., Daley, J., Chen, W., Witzig, T.E., Habermann, T.M., Kutok, J.L., and Shipp, M.A. (2008b). SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 111, 2230-2237.

Chen, L., Monti, S., Juszczynski, P., Ouyang, J., Chapuy, B., Neuberg, D., Doench, J.G., Bogusz, A.M., Habermann, T.M., Dogan, A., *et al.* (2013). SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT- dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas. *Cancer Cell* 23, 826-838.

Cheng, A.M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J.B., and Pawson, T. (1995). Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378, 303-306.

Cheng, S., Coffey, G., Zhang, X.H., Shaknovich, R., Song, Z., Lu, P., Pandey, A., Melnick, A.M., Sinha, U., and Wang, Y.L. (2011). SYK inhibition and response prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 118, 6342-6352.

Chiarini, F., Paganelli, F., Martelli, A.M., and Evangelisti, C. (2020). The Role Played by Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* 21.

Chilov, D., Sinjushina, N., Rita, H., Taketo, M.M., Mäkelä, T.P., and Partanen, J. (2011). Phosphorylated β -catenin localizes to centrosomes of neuronal progenitors and is required for cell polarity and neurogenesis in developing midbrain. *Dev Biol* 357, 259-268.

Citterio, C., Menacho-Márquez, M., García-Escudero, R., Larive, R.M., Barreiro, O., Sánchez-Madrid, F., Paramio, J.M., and Bustelo, X.R. (2012). The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells. *Sci Signal* 5, ra71.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.

Cole, M.F., Johnstone, S.E., Newman, J.J., Kagey, M.H., and Young, R.A. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 22, 746-755.

Coluccia, A.M., Vacca, A., Duñach, M., Mologni, L., Redaelli, S., Bustos, V.H., Benati, D., Pinna, L.A., and Gambacorti-Passerini, C. (2007). Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 26, 1456-1466.

Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., and Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163, 847-857.

Conacci-Sorrell, M.E., Ben-Yedidia, T., Shtutman, M., Feinstein, E., Einat, P., and Ben-Ze'ev, A. (2002). Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2058-2072.

Cooke, M., Baker, M.J., and Kazanietz, M.G. (2020). Rac-GEF/Rac Signaling and Metastatic Dissemination in Lung Cancer. *Front Cell Dev Biol* 8, 118.

Coopman, P.J., Do, M.T., Barth, M., Bowden, E.T., Hayes, A.J., Basyuk, E., Blancato, J.K., Vezza, P.R., McLeskey, S.W., Mangeat, P.H., *et al.* (2000). The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 406, 742-747.

Coopman, P.J., and Mueller, S.C. (2006). The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression. *Cancer Lett* 241, 159-173.

Coppola, J., Bryant, S., Koda, T., Conway, D., and Barbacid, M. (1991). Mechanism of activation of the vav protooncogene. *Cell Growth Differ* 2, 95-105.

Cremer, A., Ellegast, J.M., Alexe, G., Frank, E.S., Ross, L., Chu, S.H., Pikman, Y., Robichaud, A., Goodale, A., Häupl, B., *et al.* (2020). Resistance Mechanisms to SYK Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov* 10, 214-231.

Dagenais, G.R., Leong, D.P., Rangarajan, S., Lanas, F., Lopez-Jaramillo, P., Gupta, R., Diaz, R., Avezum, A., Oliveira, G.B.F., Wielgosz, A., *et al.* (2020). Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* 395, 785-794.

Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol* 41, 599-613.

Dasgupta, N., Thakur, B.K., Ta, A., Dutta, P., and Das, S. (2017). Suppression of Spleen Tyrosine Kinase (Syk) by Histone Deacetylation Promotes, Whereas BAY61-3606, a Synthetic Syk Inhibitor Abrogates Colonocyte Apoptosis by ERK Activation. *J Cell Biochem* 118, 191-203.

David, M.D., Yeramian, A., Duñach, M., Llovera, M., Cantí, C., de Herreros, A.G., Comella, J.X., and Herreros, J. (2008). Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation. *J Cell Sci* *121*, 2718-2730.

de Castro, R.O. (2011). Regulation and function of syk tyrosine kinase in mast cell signaling and beyond. *J Signal Transduct* *2011*, 507291.

de Castro, R.O., Zhang, J., Groves, J.R., Barbu, E.A., and Siraganian, R.P. (2012). Once phosphorylated, tyrosines in carboxyl terminus of protein-tyrosine kinase Syk interact with signaling proteins, including TULA-2, a negative regulator of mast cell degranulation. *J Biol Chem* *287*, 8194-8204.

de Castro, R.O., Zhang, J., Jamur, M.C., Oliver, C., and Siraganian, R.P. (2010). Tyrosines in the carboxyl terminus regulate Syk kinase activity and function. *J Biol Chem* *285*, 26674-26684.

de Gorter, D.J., Beuling, E.A., Kersseboom, R., Middendorp, S., van Gils, J.M., Hendriks, R.W., Pals, S.T., and Spaargaren, M. (2007). Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* *26*, 93-104.

De, P., Carlson, J.H., Jepperson, T., Willis, S., Leyland-Jones, B., and Dey, N. (2017). RAC1 GTP-ase signals Wnt-beta-catenin pathway mediated integrin-directed metastasis-associated tumor cell phenotypes in triple negative breast cancers. *Oncotarget* *8*, 3072-3103.

de Rooij, M.F., Kuil, A., Geest, C.R., Eldering, E., Chang, B.Y., Buggy, J.J., Pals, S.T., and Spaargaren, M. (2012). The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *119*, 2590-2594.

Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T., and Altman, A. (1996). Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* *5*, 591-604.

Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Hernandez, J., Rottapel, R., and Altman, A. (1998). Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity* *9*, 595-605.

Deng, G.M., Kytтарыs, V.C., and Tsokos, G.C. (2016). Targeting Syk in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol* *7*, 78.

Dimitrova, Y.N., Li, J., Lee, Y.T., Rios-Esteves, J., Friedman, D.B., Choi, H.J., Weis, W.I., Wang, C.Y., and Chazin, W.J. (2010). Direct ubiquitination of beta-catenin by Siah-1 and regulation by the exchange factor TBL1. *J Biol Chem* *285*, 13507-13516.

Dong, S.W., Ma, L., Xu, N., Yan, H.Q., Liu, H.Y., Li, Y.W., and Zhang, P. (2011). Research on the reactivation of Syk expression caused by the inhibition of DNA promoter methylation in the lung cancer. *Neoplasma* *58*, 89-95.

Du, C., Jaggi, M., Zhang, C., and Balaji, K.C. (2009a). Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin. *Cancer Res* *69*, 1117-1124.

Du, C., Zhang, C., Li, Z., Biswas, M.H., and Balaji, K.C. (2012). Beta-catenin phosphorylated at threonine 120 antagonizes generation of active beta-catenin by spatial localization in trans-Golgi network. *PLoS One* *7*, e33830.

Du, M.J., Chen, X.D., Zhou, X.L., Wan, Y.J., Lan, B., Zhang, C.Z., and Cao, Y. (2014). Estrogen induces Vav1 expression in human breast cancer cells. *PLoS One* *9*, e99052.

Du, Y.C., Oshima, H., Oguma, K., Kitamura, T., Itadani, H., Fujimura, T., Piao, Y.S., Yoshimoto, T., Minamoto, T., Kotani, H., *et al.* (2009b). Induction and down-regulation of Sox17 and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* *137*, 1346-1357.

Efremov, D.G., Turkalj, S., and Laurenti, L. (2020). Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies. *Cancers (Basel)* *12*.

Emilien, G. (2016). Rôle de la tyrosine Kinase Syk dans la régulation du processus métastatique du mélanome (Université Côte d'Azur), pp. 241.

Essers, M.A., de Vries-Smits, L.M., Barker, N., Polderman, P.E., Burgering, B.M., and Korswagen, H.C. (2005). Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 308, 1181-1184.

Esufali, S., and Bapat, B. (2004). Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 23, 8260-8271.

Fagotto, F. (2013). Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of β -catenin. *EMBO Rep* 14, 422-433.

Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., and Lu, Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282, 11221-11229.

Farago, M., Yarnitzky, T., Shalom, B., and Katzav, S. (2020). Vav1 mutations: What makes them oncogenic? *Cell Signal* 65, 109438.

Feldman, A.L., Sun, D.X., Law, M.E., Novak, A.J., Attygalle, A.D., Thorland, E.C., Fink, S.R., Vrana, J.A., Caron, B.L., Morice, W.G., *et al.* (2008). Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 22, 1139-1143.

Fernandez-Zapico, M.E., Gonzalez-Paz, N.C., Weiss, E., Savoy, D.N., Molina, J.R., Fonseca, R., Smyrk, T.C., Chari, S.T., Urrutia, R., and Billadeau, D.D. (2005). Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell* 7, 39-49.

Fischer, K.D., Kong, Y.Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengère, L.E., Koziarzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., *et al.* (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* 8, 554-562.

Fitzmaurice, C., Akinyemiju, T.F., Al Lami, F.H., Alam, T., Alizadeh-Navaei, R., Allen, C., Alsharif, U., Alvis-Guzman, N., Amini, E., Anderson, B.O., *et al.* (2018). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 4, 1553-1568.

Fotheringham, J.A., Coalson, N.E., and Raab-Traub, N. (2012). Epstein-Barr virus latent membrane protein-2A induces ITAM/Syk- and Akt-dependent epithelial migration through α -integrin membrane translocation. *J Virol* 86, 10308-10320.

Fray, M.A., Charpentier, J.C., Sylvain, N.R., Seminario, M.C., and Bunnell, S.C. (2020). Vav2 lacks Ca. *J Cell Sci* 133.

Fruchon, S., Kheirallah, S., Al Saati, T., Ysebaert, L., Laurent, C., Leseux, L., Fournié, J.J., Laurent, G., and Bezombes, C. (2012). Involvement of the Syk-mTOR pathway in follicular lymphoma cell invasion and angiogenesis. *Leukemia* 26, 795-805.

Fujisawa, M., Sakata-Yanagimoto, M., Nishizawa, S., Komori, D., Gershon, P., Kiryu, M., Tanzima, S., Fukumoto, K., Enami, T., Muratani, M., *et al.* (2018). Activation of RHOA-VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia* 32, 694-702.

Fuller, G.L., Williams, J.A., Tomlinson, M.G., Eble, J.A., Hanna, S.L., Pöhlmann, S., Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y., Watson, S.P., and Pearce, A.C. (2007). The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J Biol Chem* 282, 12397-12409.

Furlong, M.T., Mahrenholz, A.M., Kim, K.H., Ashendel, C.L., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1997). Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta* 1355, 177-190.

Galluzzi, L., Spranger, S., Fuchs, E., and López-Soto, A. (2019). WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance. *Trends Cell Biol* 29, 44-65.

Gao, C., Chen, G., Zhang, D.H., Zhang, J., Kuan, S.F., Hu, W., Esni, F., Gao, X., Guan, J.L., Chu, E., *et al.* (2019). PYK2 Is Involved in Premalignant Acinar Cell Reprogramming and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Maintenance by Phosphorylating β -Catenin. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 8, 561-578.

Gao, D., Wang, L., Zhang, H., Yan, X., Yang, J., Zhou, R., Chang, X., Sun, Y., Tian, S., Yao, Z., *et al.* (2018). Spleen tyrosine kinase SYK(L) interacts with YY1 and coordinately suppresses SNAI2 transcription in lung cancer cells. *FEBS J* 285, 4229-4245.

Geahlen, R.L. (2009). Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1115-1127.

Gelebart, P., Anand, M., Armanious, H., Peters, A.C., Dien Bard, J., Amin, H.M., and Lai, R. (2008). Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood* 112, 5171-5179.

Ghotra, V.P., He, S., van der Horst, G., Nijhoff, S., de Bont, H., Lekkerkerker, A., Janssen, R., Jenster, G., van Leenders, G.J., Hoogland, A.M., *et al.* (2015). SYK is a candidate kinase target for the treatment of advanced prostate cancer. *Cancer Res* 75, 230-240.

Giambra, V., Jenkins, C.E., Lam, S.H., Hoofd, C., Belmonte, M., Wang, X., Gusscott, S., Gracias, D., and Weng, A.P. (2015). Leukemia stem cells in T-ALL require active Hif1 α and Wnt signaling. *Blood* 125, 3917-3927.

Glass, D.A., Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A., *et al.* (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8, 751-764.

Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Carsetti, L., Berno, V., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2009). Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 23, 686-697.

Goodman, P.A., Wood, C.M., Vassilev, A., Mao, C., and Uckun, F.M. (2001). Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 20, 3969-3978.

Grassi, S., Palumbo, S., Mariotti, V., Liberati, D., Guerrini, F., Ciabatti, E., Salehzadeh, S., Baratè, C., Balducci, S., Ricci, F., *et al.* (2019). The WNT Pathway Is Relevant for the BCR-ABL1-Independent Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Front Oncol* 9, 532.

Grassilli, S., Brugnoli, F., Lattanzio, R., Buglioni, S., and Bertagnolo, V. (2020). Vav1 Down-Modulates Akt2 Expression in Cells from Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Nuclear Vav1 as a Potential Regulator of Akt Related Malignancy in Pancreatic Cancer. *Biomedicines* 8.

Grassilli, S., Brugnoli, F., Lattanzio, R., Marchisio, M., Perracchio, L., Piantelli, M., Bavelloni, A., Capitani, S., and Bertagnolo, V. (2018). Vav1 downmodulates Akt in different breast cancer subtypes: a new promising chance to improve breast cancer outcome. *Mol Oncol* 12, 1012-1025.

Grassilli, S., Brugnoli, F., Lattanzio, R., Rossi, C., Perracchio, L., Mottolese, M., Marchisio, M., Palomba, M., Nika, E., Natali, P.G., *et al.* (2014). High nuclear level of Vav1 is a positive prognostic factor in early invasive breast tumors: a role in modulating genes related to the efficiency of metastatic process. *Oncotarget* 5, 4320-4336.

Griffin, J.N., Del Viso, F., Duncan, A.R., Robson, A., Hwang, W., Kulkarni, S., Liu, K.J., and Khokha, M.K. (2018). RAPGEF5 Regulates Nuclear Translocation of β -Catenin. *Dev Cell* 44, 248-260.e244.

Grädler, U., Schwarz, D., Dresing, V., Musil, D., Bomke, J., Frech, M., Greiner, H., Jäkel, S., Rysiok, T., Müller-Pompalla, D., *et al.* (2013). Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch. *J Mol Biol* 425, 309-333.

Guo, X., Zhang, R., Liu, J., Li, M., Song, C., Dovat, S., Li, J., and Ge, Z. (2015). Characterization of LEF1 High Expression and Novel Mutations in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One* 10, e0125429.

Gutierrez, A., Tschumper, R.C., Wu, X., Shanafelt, T.D., Eckel-Passow, J., Huddleston, P.M., Slager, S.L., Kay, N.E., and Jelinek, D.F. (2010). LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* *116*, 2975-2983.

Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., and Kemler, R. (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* *121*, 3529-3537.

Hahn, C.K., Berchuck, J.E., Ross, K.N., Kakoza, R.M., Clauser, K., Schinzel, A.C., Ross, L., Galinsky, I., Davis, T.N., Silver, S.J., *et al.* (2009). Proteomic and genetic approaches identify Syk as an AML target. *Cancer Cell* *16*, 281-294.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Hashimoto, T., Yamashita, S., Yoshida, H., Taniguchi, H., Ushijima, T., Yamada, T., Saito, Y., Ochiai, A., Sekine, S., and Hiraoka, N. (2017). WNT Pathway Gene Mutations Are Associated With the Presence of Dysplasia in Colorectal Sessile Serrated Adenoma/Polyps. *Am J Surg Pathol* *41*, 1188-1197.

Hatton, O., Lambert, S.L., Phillips, L.K., Vaysberg, M., Natkunam, Y., Esquivel, C.O., Krams, S.M., and Martinez, O.M. (2013). Syk-induced phosphatidylinositol-3-kinase activation in Epstein-Barr virus posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant* *13*, 883-890.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* *281*, 1509-1512.

Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R.L., and Martin, J.F. (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* *332*, 458-461.

Heizmann, B., Reth, M., and Infantino, S. (2010). Syk is a dual-specificity kinase that self-regulates the signal output from the B-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 18563-18568.

Heuberger, J., and Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a002915.

Hinck, L., Näthke, I.S., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* *125*, 1327-1340.

Hobert, O., Jallal, B., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1994). Novel signaling pathway suggested by SH3 domain-mediated p95vav/heterogeneous ribonucleoprotein K interaction. *J Biol Chem* *269*, 20225-20228.

Hoeller, C., Thallinger, C., Pratscher, B., Bister, M.D., Schicher, N., Loewe, R., Heere-Ress, E., Roka, F., Sexl, V., and Pehamberger, H. (2005). The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* *124*, 1293-1299.

Hofbauer, S.W., Krenn, P.W., Ganghammer, S., Asslaber, D., Pichler, U., Oberascher, K., Henschler, R., Wallner, M., Kerschbaum, H., Greil, R., *et al.* (2014). Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance, but not motility, of chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* *123*, 2181-2188.

Hollmann, A., Aloyz, R., Baker, K., Dirnhofer, S., Owens, T., Sladek, R., and Tzankov, A. (2010). Vav-1 expression correlates with NFκB activation and CD40-mediated cell death in diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Hematol Oncol* *28*, 142-150.

Hong, J., Hu, K., Yuan, Y., Sang, Y., Bu, Q., Chen, G., Yang, L., Li, B., Huang, P., Chen, D., *et al.* (2012). CHK1 targets spleen tyrosine kinase (L) for proteolysis in hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* *122*, 2165-2175.

Hong, J., Yuan, Y., Wang, J., Liao, Y., Zou, R., Zhu, C., Li, B., Liang, Y., Huang, P., Wang, Z., *et al.* (2014). Expression of variant isoforms of the tyrosine kinase SYK determines the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 74, 1845-1856.

Hong, J.J., Yankee, T.M., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2002). Regulation of signaling in B cells through the phosphorylation of Syk on linker region tyrosines. A mechanism for negative signaling by the Lyn tyrosine kinase. *J Biol Chem* 277, 31703-31714.

Hoogetboom, D., and Burgering, B.M. (2009). Should I stay or should I go: beta-catenin decides under stress. *Biochim Biophys Acta* 1796, 63-74.

Hornstein, I., Pikarsky, E., Groysman, M., Amir, G., Peylan-Ramu, N., and Katzav, S. (2003). The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas. *J Pathol* 199, 526-533.

Houlard, M., Arudchandran, R., Regnier-Ricard, F., Germani, A., Gisselbrecht, S., Blank, U., Rivera, J., and Varin-Blank, N. (2002). Vav1 is a component of transcriptionally active complexes. *J Exp Med* 195, 1115-1127.

Houlard, M., Romero-Portillo, F., Germani, A., Depaux, A., Regnier-Ricard, F., Gisselbrecht, S., and Varin-Blank, N. (2005). Characterization of VIK-1: a new Vav-interacting Kruppel-like protein. *Oncogene* 24, 28-38.

Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R.F., and Waterman, M.L. (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* 28, 53-57.

Hu, M.C., and Rosenblum, N.D. (2005). Smad1, beta-catenin and Tcf4 associate in a molecular complex with the Myc promoter in dysplastic renal tissue and cooperate to control Myc transcription. *Development* 132, 215-225.

Huang, P.H., Lu, P.J., Ding, L.Y., Chu, P.C., Hsu, W.Y., Chen, C.S., Tsao, C.C., Chen, B.H., Lee, C.T., and Shan, Y.S. (2017). TGF β promotes mesenchymal phenotype of pancreatic cancer cells, in part, through epigenetic activation of VAV1. *Oncogene* 36, 2202-2214.

Huber, A.H., Stewart, D.B., Laurents, D.V., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 276, 12301-12309.

Huber, A.H., and Weis, W.I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105, 391-402.

Hughes, C.E., Pollitt, A.Y., Mori, J., Eble, J.A., Tomlinson, M.G., Hartwig, J.H., O'Callaghan, C.A., Fütterer, K., and Watson, S.P. (2010). CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood* 115, 2947-2955.

Jakus, Z., Fodor, S., Abram, C.L., Lowell, C.A., and Mócsai, A. (2007). Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. *Trends Cell Biol* 17, 493-501.

Jamieson, C., Lui, C., Brocardo, M.G., Martino-Echarri, E., and Henderson, B.R. (2015). Rac1 augments Wnt signaling by stimulating β -catenin-lymphoid enhancer factor-1 complex assembly independent of β -catenin nuclear import. *J Cell Sci* 128, 3933-3946.

Janovská, P., and Bryja, V. (2017). Wnt signalling pathways in chronic lymphocytic leukaemia and B-cell lymphomas. *Br J Pharmacol* 174, 4701-4715.

Jho, E.H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.K., Freund, J.N., and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22, 1172-1183.

Jin, Q., Liu, C., Yan, C., Tao, B., Li, Z., and Cai, Z. (2012). 5-aza-CdR induces the demethylation of Syk promoter in nasopharyngeal carcinoma cell. *Gene* 511, 224-226.

Kaidi, A., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* 9, 210-217.

Kassouf, T., Larive, R.M., Morel, A., Urbach, S., Bettache, N., Marcial Medina, M.C., Mèrezègue, F., Freiss, G., Peter, M., Boissière-Michot, F., *et al.* (2019). The Syk Kinase

Promotes Mammary Epithelial Integrity and Inhibits Breast Cancer Invasion by Stabilizing the E-Cadherin/Catenin Complex. *Cancers (Basel)* *11*.

Katz, E., Dubois-Marshall, S., Sims, A.H., Faratian, D., Li, J., Smith, E.S., Quinn, J.A., Edward, M., Meehan, R.R., Evans, E.E., *et al.* (2010). A gene on the HER2 amplicon, C35, is an oncogene in breast cancer whose actions are prevented by inhibition of Syk. *Br J Cancer* *103*, 401-410.

Katzav, S. (2009). Vav1: a hematopoietic signal transduction molecule involved in human malignancies. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 1245-1248.

Katzav, S. (2015). Vav1: A Dr. Jekyll and Mr. Hyde protein--good for the hematopoietic system, bad for cancer. *Oncotarget* *6*, 28731-28742.

Katzav, S., Cleveland, J.L., Heslop, H.E., and Pulido, D. (1991). Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential. *Mol Cell Biol* *11*, 1912-1920.

Katzav, S., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J* *8*, 2283-2290.

Keshvara, L.M., Isaacson, C., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1997). Syk activation and dissociation from the B-cell antigen receptor is mediated by phosphorylation of tyrosine 130. *J Biol Chem* *272*, 10377-10381.

Keshvara, L.M., Isaacson, C.C., Yankee, T.M., Sarac, R., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1998). Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling. *J Immunol* *161*, 5276-5283.

Khan, A.S., Hojjat-Farsangi, M., Daneshmanesh, A.H., Hansson, L., Kokhaei, P., Österborg, A., Mellstedt, H., and Moshfegh, A. (2016). Dishevelled proteins are significantly upregulated in chronic lymphocytic leukaemia. *Tumour Biol* *37*, 11947-11957.

Kim, Y.J., Sekiya, F., Poulin, B., Bae, Y.S., and Rhee, S.G. (2004). Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma2. *Mol Cell Biol* *24*, 9986-9999.

Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., O'Brien, S., Gribben, J., and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* *3*, 16096.

Ko, T., Sharma, R., and Li, S. (2020). Genome-wide screening identifies novel genes implicated in cellular sensitivity to BRAF. *Oncogene* *39*, 723-738.

Kolligs, F.T., Nieman, M.T., Winer, I., Hu, G., Van Mater, D., Feng, Y., Smith, I.M., Wu, R., Zhai, Y., Cho, K.R., *et al.* (2002). ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell* *1*, 145-155.

Koni, M., Pinnarò, V., and Brizzi, M.F. (2020). The Wnt Signalling Pathway: A Tailored Target in Cancer. *Int J Mol Sci* *21*.

Krawczyk, C., Oliveira-dos-Santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P.S., Snapper, S., Alt, F., and Penninger, J.M. (2002). Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* *16*, 331-343.

Krisenko, M.O., and Geahlen, R.L. (2015). Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer. *Biochim Biophys Acta* *1853*, 254-263.

Ku, G., Malissen, B., and Mattei, M.G. (1994). Chromosomal location of the Syk and ZAP-70 tyrosine kinase genes in mice and humans. *Immunogenetics* *40*, 300-302.

Kulathu, Y., Grothe, G., and Reth, M. (2009). Autoinhibition and adapter function of Syk. *Immunol Rev* *232*, 286-299.

Kulathu, Y., Hobeika, E., Turchinovich, G., and Reth, M. (2008). The kinase Syk as an adaptor controlling sustained calcium signalling and B-cell development. *EMBO J* *27*, 1333-1344.

Kunze, E., Wendt, M., and Schlott, T. (2006). Promoter hypermethylation of the 14-3-3 sigma, SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. *Int J Mol Med* *18*, 547-557.

Larive, R.M., Urbach, S., Poncet, J., Jouin, P., Mascré, G., Sahuquet, A., Mangeat, P.H., Coopman, P.J., and Bettache, N. (2009). Phosphoproteomic analysis of Syk kinase signaling in human cancer cells reveals its role in cell-cell adhesion. *Oncogene* *28*, 2337-2347.

Latour, S., Zhang, J., Siraganian, R.P., and Veillette, A. (1998). A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *EMBO J* *17*, 2584-2595.

Law, C.L., Chandran, K.A., Sidorenko, S.P., and Clark, E.A. (1996). Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* *16*, 1305-1315.

Layton, T., Stalens, C., Gunderson, F., Goodison, S., and Silletti, S. (2009). Syk tyrosine kinase acts as a pancreatic adenocarcinoma tumor suppressor by regulating cellular growth and invasion. *Am J Pathol* *175*, 2625-2636.

Lazarian, G., Friedrich, C., Quinquenel, A., Tran, J., Ouriemmi, S., Dondi, E., Martin, A., Mihoub, I., Chiron, D., Bellanger, C., *et al.* (2020a). Stabilization of beta-catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF-kB target genes transcription in mantle cell lymphoma. *Oncogene* *39*, 2934-2947.

Lazarian, G., Friedrich, C., Quinquenel, A., Tran, J., Ouriemmi, S., Dondi, E., Martin, A., Mihoub, I., Chiron, D., Bellanger, C., *et al.* (2020b). Stabilization of β -catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF-kB target genes transcription in mantle cell lymphoma. *Oncogene* *39*, 2934-2947.

Lazer, G., Idelchuk, Y., Schapira, V., Pikarsky, E., and Katzav, S. (2009). The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumorigenesis. *J Pathol* *219*, 25-34.

Lazer, G., and Katzav, S. (2011). Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy? *Cell Signal* *23*, 969-979.

Lazer, G., Pe'er, L., Farago, M., Machida, K., Mayer, B.J., and Katzav, S. (2010). Tyrosine residues at the carboxyl terminus of Vav1 play an important role in regulation of its biological activity. *J Biol Chem* *285*, 23075-23085.

Le Roy, C., Deglesne, P.A., Chevallier, N., Beitar, T., Eclache, V., Quettier, M., Boubaya, M., Letestu, R., Lévy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., *et al.* (2012). The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *120*, 356-365.

Leseux, L., Hamdi, S.M., Al Saati, T., Capilla, F., Recher, C., Laurent, G., and Bezombes, C. (2006). Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood* *108*, 4156-4162.

Li, N., Lu, N., and Xie, C. (2019). The Hippo and Wnt signalling pathways: crosstalk during neoplastic progression in gastrointestinal tissue. *FEBS J* *286*, 3745-3756.

Lindsey, J.C., Kawauchi, D., Schwalbe, E.C., Solecki, D.J., Selby, M.P., McKinnon, P.J., Olson, J.M., Hayden, J.T., Grundy, R.G., Ellison, D.W., *et al.* (2015). Cross-species epigenetics identifies a critical role for VAV1 in SHH subgroup medulloblastoma maintenance. *Oncogene* *34*, 4746-4757.

Liu, C., Kato, Y., Zhang, Z., Do, V.M., Yankner, B.A., and He, X. (1999). beta-Trop couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates Xenopus axis formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6273-6278.

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* *108*, 837-847.

Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* *432*, 307-315.

Luangdilok, S., Box, C., Patterson, L., Court, W., Harrington, K., Pitkin, L., Rhys-Evans, P., O-charoenrat, P., and Eccles, S. (2007). Syk tyrosine kinase is linked to cell motility and progression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 67, 7907-7916.

Luo, K. (2017). Signaling Cross Talk between TGF- β /Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9.

Lupher, M.L., Rao, N., Lill, N.L., Andoniou, C.E., Miyake, S., Clark, E.A., Druker, B., and Band, H. (1998). Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323. *J Biol Chem* 273, 35273-35281.

Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., *et al.* (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 22, 1184-1193.

Lévy, L., Wei, Y., Labalette, C., Wu, Y., Renard, C.A., Buendia, M.A., and Neuveut, C. (2004). Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-Tcf4 interaction. *Mol Cell Biol* 24, 3404-3414.

López-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., and Bustelo, X.R. (2000). Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol* 20, 1678-1691.

Ma, B., and Hottiger, M.O. (2016). Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol* 7, 378.

Ma, L., Dong, S., Zhang, P., Xu, N., Yan, H., Liu, H., Li, Y., and Zhou, Q. (2010). The relationship between methylation of the Syk gene in the promoter region and the genesis of lung cancer. *Clin Lab* 56, 407-416.

Makhoul, S., Dorschel, S., Gambaryan, S., Walter, U., and Jurk, K. (2019). Feedback Regulation of Syk by Protein Kinase C in Human Platelets. *Int J Mol Sci* 21.

Mancini, M., Soverini, S., Gugliotta, G., Santucci, M.A., Rosti, G., Cavo, M., Martinelli, G., and Castagnetti, F. (2017). Chibby 1: a new component of β -catenin-signaling in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* 8, 88244-88250.

Mangolini, M., Götte, F., Moore, A., Ammon, T., Oelsner, M., Lutzny-Geier, G., Klein-Hitpass, L., Williamson, J.C., Lehner, P.J., Dürig, J., *et al.* (2018). Notch2 controls non-autonomous Wnt-signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun* 9, 3839.

Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J., *et al.* (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1603-1608.

Mansueto, M.S., Reens, A., Rakhilina, L., Chi, A., Pan, B.S., and Miller, J.R. (2019). A reevaluation of the spleen tyrosine kinase (SYK) activation mechanism. *J Biol Chem* 294, 7658-7668.

Martin-Orozco, E., Sanchez-Fernandez, A., Ortiz-Parra, I., and Ayala-San Nicolas, M. (2019). WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Front Immunol* 10, 2854.

Matsusaka, S., Tohyama, Y., He, J., Shi, Y., Hazama, R., Kadono, T., Kurihara, R., Tohyama, K., and Yamamura, H. (2005). Protein-tyrosine kinase, Syk, is required for CXCL12-induced polarization of B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 1163-1169.

Mbom, B.C., Siemers, K.A., Ostrowski, M.A., Nelson, W.J., and Barth, A.I. (2014). Nek2 phosphorylates and stabilizes β -catenin at mitotic centrosomes downstream of Plk1. *Mol Biol Cell* 25, 977-991.

Memarian, A., Hojjat-Farsangi, M., Asgarian-Omran, H., Younesi, V., Jeddi-Tehrani, M., Sharifian, R.A., Khoshnoodi, J., Razavi, S.M., Rabbani, H., and Shokri, F. (2009). Variation in

WNT genes expression in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 50, 2061-2070.

Menacho-Márquez, M., García-Escudero, R., Ojeda, V., Abad, A., Delgado, P., Costa, C., Ruiz, S., Alarcón, B., Paramio, J.M., and Bustelo, X.R. (2013). The Rho exchange factors Vav2 and Vav3 favor skin tumor initiation and promotion by engaging extracellular signaling loops. *PLoS Biol* 11, e1001615.

Miller, P.G., Al-Shahrour, F., Hartwell, K.A., Chu, L.P., Järås, M., Puram, R.V., Puissant, A., Callahan, K.P., Ashton, J., McConkey, M.E., *et al.* (2013). In Vivo RNAi screening identifies a leukemia-specific dependence on integrin beta 3 signaling. *Cancer Cell* 24, 45-58.

Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y., and Furukawa, Y. (2001). Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 12, 469-476.

Mohammad, D.K., Nore, B.F., Gustafsson, M.O., Mohamed, A.J., and Smith, C.I.E. (2016). Protein kinase B (AKT) regulates SYK activity and shuttling through 14-3-3 and importin 7. *Int J Biochem Cell Biol* 78, 63-74.

Moncayo, G., Grzmil, M., Smirnova, T., Zmarz, P., Huber, R.M., Hynx, D., Kohler, H., Wang, Y., Hotz, H.R., Hynes, N.E., *et al.* (2018). SYK inhibition blocks proliferation and migration of glioma cells and modifies the tumor microenvironment. *Neuro Oncol* 20, 621-631.

Montesor, A., Toffali, L., Rigo, A., Ferrarini, I., Vinante, F., and Laudanna, C. (2018). CXCR4- and BCR-triggered integrin activation in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells depends on JAK2-activated Bruton's tyrosine kinase. *Oncotarget* 9, 35123-35140.

Moon, K.D., Post, C.B., Durden, D.L., Zhou, Q., De, P., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2005). Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 280, 1543-1551.

Morgan, R.G., Pearn, L., Liddiard, K., Pumford, S.L., Burnett, A.K., Tonks, A., and Darley, R.L. (2013). γ -Catenin is overexpressed in acute myeloid leukemia and promotes the stabilization and nuclear localization of β -catenin. *Leukemia* 27, 336-343.

Morgan, R.G., Ridsdale, J., Payne, M., Heesom, K.J., Wilson, M.C., Davidson, A., Greenhough, A., Davies, S., Williams, A.C., Blair, A., *et al.* (2019). LEF-1 drives aberrant β -catenin nuclear localization in myeloid leukemia cells. *Haematologica* 104, 1365-1377.

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.

Moroni, M., Soldatenkov, V., Zhang, L., Zhang, Y., Stoica, G., Gehan, E., Rashidi, B., Singh, B., Ozdemirli, M., and Mueller, S.C. (2004). Progressive loss of Syk and abnormal proliferation in breast cancer cells. *Cancer Res* 64, 7346-7354.

Moskalev, E.A., Luckert, K., Vorobjev, I.A., Mastitsky, S.E., Gladkikh, A.A., Stephan, A., Schrenk, M., Kaplanov, K.D., Kalashnikova, O.B., Pötz, O., *et al.* (2012). Concurrent epigenetic silencing of wnt/ β -catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer* 12, 213.

Movilla, N., Dosil, M., Zheng, Y., and Bustelo, X.R. (2001). How Vav proteins discriminate the GTPases Rac1 and RhoA from Cdc42. *Oncogene* 20, 8057-8065.

Mukherjee, N., Dasgupta, H., Bhattacharya, R., Pal, D., Roy, R., Islam, S., Alam, N., Biswas, J., Roy, A., Roychoudhury, S., *et al.* (2016). Frequent inactivation of MCC/CTNNBIP1 and overexpression of phospho-beta-catenin(Y654) are associated with breast carcinoma: Clinical and prognostic significance. *Biochim Biophys Acta* 1862, 1472-1484.

Mukherjee, N., and Panda, C.K. (2020). Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as Chemotherapeutic Target in Breast Cancer: An Update on Pros and Cons. *Clin Breast Cancer*.

Muthusamy, V., Duraisamy, S., Bradbury, C.M., Hobbs, C., Curley, D.P., Nelson, B., and Bosenberg, M. (2006). Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer Res* 66, 11187-11193.

Muñoz, J.P., Huichalaf, C.H., Orellana, D., and Maccioni, R.B. (2007). cdk5 modulates beta- and delta-catenin/Pin1 interactions in neuronal cells. *J Cell Biochem* 100, 738-749.

Mócsai, A., Abram, C.L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L.L., and Lowell, C.A. (2006). Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 7, 1326-1333.

Mócsai, A., Ruland, J., and Tybulewicz, V.L. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 10, 387-402.

Nakashima, H., Natsugoe, S., Ishigami, S., Okumura, H., Matsumoto, M., Hokita, S., and Aikou, T. (2006). Clinical significance of nuclear expression of spleen tyrosine kinase (Syk) in gastric cancer. *Cancer Lett* 236, 89-94.

Naldi, A., Larive, R.M., Czerwinska, U., Urbach, S., Montcourrier, P., Roy, C., Solassol, J., Freiss, G., Coopman, P.J., and Radulescu, O. (2017). Reconstruction and signal propagation analysis of the Syk signaling network in breast cancer cells. *PLoS Comput Biol* 13, e1005432.

Nelson, W.J., Dickinson, D.J., and Weis, W.I. (2013). Roles of cadherins and catenins in cell-cell adhesion and epithelial cell polarity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116, 3-23.

Ng, O.H., Erbilgin, Y., Firtina, S., Celkan, T., Karakas, Z., Aydogan, G., Turkkan, E., Yildirmak, Y., Timur, C., Zengin, E., *et al.* (2014). Deregulated WNT signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J* 4, e192.

Nhieu, J.T., Renard, C.A., Wei, Y., Cherqui, D., Zafrani, E.S., and Buendia, M.A. (1999). Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* 155, 703-710.

Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., and Akiyama, T. (2004). DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23, 8520-8526.

Niuro, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2, 945-956.

Náger, M., Santacana, M., Bhardwaj, D., Valls, J., Ferrer, I., Nogués, P., Cantí, C., and Herreros, J. (2015). Nuclear phosphorylated Y142 β -catenin accumulates in astrocytomas and glioblastomas and regulates cell invasion. *Cell Cycle* 14, 3644-3655.

Oda, Y., Kasakura, K., Fujigaki, I., Kageyama, A., Okumura, K., Ogawa, H., Yashiro, T., and Nishiyama, C. (2018). The effect of PU.1 knockdown on gene expression and function of mast cells. *Sci Rep* 8, 2005.

Okazaki, H., Zhang, J., Hamawy, M.M., and Siraganian, R.P. (1997). Activation of protein-tyrosine kinase Pyk2 is downstream of Syk in Fc ϵ s1RI signaling. *J Biol Chem* 272, 32443-32447.

Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8, 1711-1717.

Parameswaran, N., Enyindah-Asonye, G., Bagheri, N., Shah, N.B., and Gupta, N. (2013). Spatial coupling of JNK activation to the B cell antigen receptor by tyrosine-phosphorylated ezrin. *J Immunol* 190, 2017-2026.

Paris, L.L., Hu, J., Galan, J., Ong, S.S., Martin, V.A., Ma, H., Tao, W.A., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2010). Regulation of Syk by phosphorylation on serine in the linker insert. *J Biol Chem* 285, 39844-39854.

Pechloff, K., Holch, J., Ferch, U., Schwenecker, M., Brunner, K., Kremer, M., Sparwasser, T., Quintanilla-Martinez, L., Zimmer-Strobl, U., Streubel, B., *et al.* (2010). The fusion kinase ITK-

SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *J Exp Med* 207, 1031-1044.

Perova, T., Grandal, I., Nutter, L.M., Papp, E., Matei, I.R., Beyene, J., Kowalski, P.E., Hitzler, J.K., Minden, M.D., Guidos, C.J., *et al.* (2014). Therapeutic potential of spleen tyrosine kinase inhibition for treating high-risk precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 6, 236ra262.

Piccolella, E., Spadaro, F., Ramoni, C., Marinari, B., Costanzo, A., Levrero, M., Thomson, L., Abraham, R.T., and Tuosto, L. (2003). Vav-1 and the IKK alpha subunit of I kappa B kinase functionally associate to induce NF-kappa B activation in response to CD28 engagement. *J Immunol* 170, 2895-2903.

Pierce, S.K., and Liu, W. (2010). The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences. *Nat Rev Immunol* 10, 767-777.

Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

Popova, L., Janovska, P., Plevova, K., Radova, L., Plesingerova, H., Borsky, M., Kotaskova, J., Kantorova, B., Hlozkova, M., Figulova, J., *et al.* (2016). Decreased WNT3 expression in chronic lymphocytic leukaemia is a hallmark of disease progression and identifies patients with worse prognosis in the subgroup with mutated IGHV. *Br J Haematol* 175, 851-859.

Prieto-Sánchez, R.M., Hernández, J.A., García, J.L., Gutiérrez, N.C., San Miguel, J., Bustelo, X.R., and Hernández, J.M. (2006). Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q. *Br J Haematol* 133, 642-645.

Qi, Y., Kong, F.M., Deng, Q., Li, J.Y., Cui, R., Pu, Y.D., Zhai, Q.L., Jia, Y.J., and Li, Y.M. (2015). Clinical significance and prognostic value of Vav1 expression in Non-small cell lung cancer. *Am J Cancer Res* 5, 2491-2497.

Quentmeier, H., Pommerenke, C., Dirks, W.G., Eberth, S., Koeppel, M., MacLeod, R.A.F., Nagel, S., Steube, K., Uphoff, C.C., and Drexler, H.G. (2019). The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies. *Sci Rep* 9, 8218.

Rao, N., Dodge, I., and Band, H. (2002). The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *J Leukoc Biol* 71, 753-763.

Rapley, J., Tybulewicz, V.L., and Rittinger, K. (2008). Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO Rep* 9, 655-661.

Rasul, E., Salamon, D., Nagy, N., Leveau, B., Banati, F., Szenthe, K., Koroknai, A., Minarovits, J., Klein, G., and Klein, E. (2014). The MEC1 and MEC2 lines represent two CLL subclones in different stages of progression towards prolymphocytic leukemia. *PLoS One* 9, e106008.

Razanadrakoto, L., Cormier, F., Lauriente, V., Dondi, E., Gardano, L., Katzav, S., Guittat, L., and Varin-Blank, N. (2015a). Mutation of Vav1 adaptor region reveals a new oncogenic activation. *Oncotarget* 6, 2524-2537.

Razanadrakoto, L., Cormier, F., Lauriente, V., Dondi, E., Gardano, L., Katzav, S., Guittat, L., and Varin-Blank, N. (2015b). Mutation of Vav1 adaptor region reveals a new oncogenic activation. *Oncotarget* 6, 2524-2537.

Razidlo, G.L., Magnine, C., Sletten, A.C., Hurley, R.M., Almada, L.L., Fernandez-Zapico, M.E., Ji, B., and McNiven, M.A. (2015). Targeting Pancreatic Cancer Metastasis by Inhibition of Vav1, a Driver of Tumor Cell Invasion. *Cancer Res* 75, 2907-2915.

Razidlo, G.L., Schroeder, B., Chen, J., Billadeau, D.D., and McNiven, M.A. (2014). Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly. *Curr Biol* 24, 86-93.

Reynolds, L.F., Smyth, L.A., Norton, T., Freshney, N., Downward, J., Kioussis, D., and Tybulewicz, V.L. (2002). Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med* 195, 1103-1114.

Rhee, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J., and Balsamo, J. (2007). Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol* 9, 883-892.

Rinaldi, A., Kwee, I., Taborelli, M., Largo, C., Uccella, S., Martin, V., Poretti, G., Gaidano, G., Calabrese, G., Martinelli, G., *et al.* (2006). Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 132, 303-316.

Robles-Valero, J., Lorenzo-Martín, L.F., Fernández-Pisonero, I., and Bustelo, X.R. (2018). Rho guanosine nucleotide exchange factors are not such bad guys after all in cancer. *Small GTPases*, 1-7.

Robles-Valero, J., Lorenzo-Martín, L.F., Menacho-Márquez, M., Fernández-Pisonero, I., Abad, A., Camós, M., Toribio, M.L., Espinosa, L., Bigas, A., and Bustelo, X.R. (2017). A Paradoxical Tumor-Suppressor Role for the Rac1 Exchange Factor Vav1 in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 32, 608-623.e609.

Rockman, S.P., Currie, S.A., Ciavarella, M., Vincan, E., Dow, C., Thomas, R.J., and Phillips, W.A. (2001). Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J Biol Chem* 276, 45113-45119.

Rodilla, V., Villanueva, A., Obrador-Hevia, A., Robert-Moreno, A., Fernández-Majada, V., Grilli, A., López-Bigas, N., Bellora, N., Albà, M.M., Torres, F., *et al.* (2009). Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6315-6320.

Rodríguez-Fdez, S., and Bustelo, X.R. (2019). The Vav GEF Family: An Evolutionary and Functional Perspective. *Cells* 8.

Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., and Clevers, H. (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 285, 1923-1926.

Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-180.

Rosén, A., Bergh, A.C., Gogok, P., Evaldsson, C., Myhrinder, A.L., Hellqvist, E., Rasul, A., Björkholm, M., Jansson, M., Mansouri, L., *et al.* (2012). Lymphoblastoid cell line with B1 cell characteristics established from a chronic lymphocytic leukemia clone by in vitro EBV infection. *Oncoimmunology* 1, 18-27.

Ruiz-Ballesteros, E., Mollejo, M., Rodriguez, A., Camacho, F.I., Algara, P., Martinez, N., Pollán, M., Sanchez-Aguilera, A., Menarguez, J., Campo, E., *et al.* (2005). Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* 106, 1831-1838.

Sada, K., Zhang, J., and Siraganian, R.P. (2000). Point mutation of a tyrosine in the linker region of Syk results in a gain of function. *J Immunol* 164, 338-344.

Saito-Diaz, K., Chen, T.W., Wang, X., Thorne, C.A., Wallace, H.A., Page-McCaw, A., and Lee, E. (2013). The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors* 31, 1-31.

Salaymeh, Y., Farago, M., Sebban, S., Shalom, B., Pikarsky, E., and Katzav, S. (2020). Vav1 and mutant K-Ras synergize in the early development of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Life Sci Alliance* 3.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.

Sebban, S., Farago, M., Gashai, D., Ilan, L., Pikarsky, E., Ben-Porath, I., and Katzav, S. (2013). Vav1 fine tunes p53 control of apoptosis versus proliferation in breast cancer. *PLoS One* 8, e54321.

Sebban, S., Farago, M., Rabinovich, S., Lazer, G., Idelchuck, Y., Ilan, L., Pikarsky, E., and Katzav, S. (2014). Vav1 promotes lung cancer growth by instigating tumor-microenvironment cross-talk via growth factor secretion. *Oncotarget* 5, 9214-9226.

Shalom, B., Farago, M., Pikarsky, E., and Katzav, S. (2018). Vav1 mutations identified in human cancers give rise to different oncogenic phenotypes. *Oncogenesis* 7, 80.

Shin, S.H., Lee, K.H., Kim, B.H., Lee, S., Lee, H.S., Jang, J.J., and Kang, G.H. (2014). Downregulation of spleen tyrosine kinase in hepatocellular carcinoma by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis. *Lab Invest* 94, 1396-1405.

Siegel, R., Kim, U., Patke, A., Yu, X., Ren, X., Tarakhovskiy, A., and Roeder, R.G. (2006). Nontranscriptional regulation of SYK by the coactivator OCA-B is required at multiple stages of B cell development. *Cell* 125, 761-774.

Simcha, I., Shtutman, M., Salomon, D., Zhurinsky, J., Sadot, E., Geiger, B., and Ben-Ze'ev, A. (1998). Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol* 141, 1433-1448.

Simon, M., Grandage, V.L., Linch, D.C., and Khwaja, A. (2005a). Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 24, 2410-2420.

Simon, M., Vanes, L., Geahlen, R.L., and Tybulewicz, V.L. (2005b). Distinct roles for the linker region tyrosines of Syk in FcepsilonRI signaling in primary mast cells. *J Biol Chem* 280, 4510-4517.

Singh, A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., and Settleman, J. (2009). A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 15, 489-500.

Singh, A., and Settleman, J. (2009). Oncogenic K-ras "addiction" and synthetic lethality. *Cell Cycle* 8, 2676-2677.

Soares-Lima, S.C., Pombo-de-Oliveira, M.S., and Carneiro, F.R.G. (2020). The multiple ways Wnt signaling contributes to acute leukemia pathogenesis. *J Leukoc Biol*.

Song, D.H., Dominguez, I., Mizuno, J., Kaut, M., Mohr, S.C., and Seldin, D.C. (2003). CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem* 278, 24018-24025.

Song, H., Hasson, P., Paroush, Z., and Courey, A.J. (2004). Groucho oligomerization is required for repression in vivo. *Mol Cell Biol* 24, 4341-4350.

Song, Z.Y., Gao, Z.H., Chu, J.H., Han, X.Z., and Qu, X.J. (2015). Downregulation of the CXCR4/CXCL12 axis blocks the activation of the Wnt/ β -catenin pathway in human colon cancer cells. *Biomed Pharmacother* 71, 46-52.

Spencer, G.J., Utting, J.C., Etheridge, S.L., Arnett, T.R., and Genever, P.G. (2006). Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* 119, 1283-1296.

Spiegelman, V.S., Slaga, T.J., Pagano, M., Minamoto, T., Ronai, Z., and Fuchs, S.Y. (2000). Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol Cell* 5, 877-882.

Stacchini, A., Aragno, M., Vallario, A., Alfarano, A., Circosta, P., Gottardi, D., Faldella, A., Rege-Cambrin, G., Thunberg, U., Nilsson, K., *et al.* (1999). MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polyclonal transformation. *Leuk Res* 23, 127-136.

Stamos, J.L., and Weis, W.I. (2013). The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a007898.

Stepniak, E., Radice, G.L., and Vasioukhin, V. (2009). Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002949.

Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Stella, A., Kojima, M., Shitoh, K., Schreiber, E.M., Day, B.W., and Liu, B. (2008). APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell* 32, 652-661.

Sun, H., Lin, D.C., Cao, Q., Pang, B., Gae, D.D., Lee, V.K.M., Lim, H.J., Doan, N., Said, J.W., Gery, S., *et al.* (2017). Identification of a Novel SYK/c-MYC/MALAT1 Signaling Pathway and Its Potential Therapeutic Value in Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res* 23, 4376-4387.

Sun, S., Xue, D., Chen, Z., Ou-Yang, Y., Zhang, J., Mai, J., Gu, J., Lu, W., Liu, X., Liu, W., *et al.* (2019). R406 elicits anti-Warburg effect via Syk-dependent and -independent mechanisms to trigger apoptosis in glioma stem cells. *Cell Death Dis* 10, 358.

Sung, Y.M., Xu, X., Sun, J., Mueller, D., Sentissi, K., Johnson, P., Urbach, E., Seillier-Moiseiwitsch, F., Johnson, M.D., and Mueller, S.C. (2009). Tumor suppressor function of Syk in human MCF10A in vitro and normal mouse mammary epithelium in vivo. *PLoS One* 4, e7445.

Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., and Postigo, A. (2011). β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19204-19209.

Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrelis, E., Luo, J.H., Ranganathan, S., Monga, D.K., Bell, A., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P. (2005). Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology* 129, 285-302.

Tang, H., Xu, Y., Zhang, Z., Zeng, S., Dong, W., Jiao, W., and Hu, X. (2019). SDF-1/CXCR4 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in rat chronic allograft nephropathy. *Mol Med Rep* 19, 3696-3706.

Taniguchi, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S., and Yamamura, H. (1991). Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* 266, 15790-15796.

ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., and Nusse, R. (2008). Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell* 3, 508-518.

Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.

Toyama, T., Iwase, H., Yamashita, H., Hara, Y., Omoto, Y., Sugiura, H., Zhang, Z., and Fujii, Y. (2003). Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett* 189, 97-102.

Travers, T., Kanagy, W.K., Mansbach, R.A., Jhamba, E., Cleyrat, C., Goldstein, B., Lidke, D.S., Wilson, B.S., and Gnanakaran, S. (2019). Combinatorial diversity of Syk recruitment driven by its multivalent engagement with Fc ϵ RI γ . *Mol Biol Cell* 30, 2331-2347.

Trenkle, T., McClelland, M., Adlkofer, K., and Welsh, J. (2000). Major transcript variants of VAV3, a new member of the VAV family of guanine nucleotide exchange factors. *Gene* 245, 139-149.

Tsang, E., Giannetti, A.M., Shaw, D., Dinh, M., Tse, J.K., Gandhi, S., Ho, H., Wang, S., Papp, E., and Bradshaw, J.M. (2008). Molecular mechanism of the Syk activation switch. *J Biol Chem* 283, 32650-32659.

Turner, M., Mee, P.J., Costello, P.S., Williams, O., Price, A.A., Duddy, L.P., Furlong, M.T., Geahlen, R.L., and Tybulewicz, V.L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378, 298-302.

Tybulewicz, V.L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17, 267-274.

Uckun, F.M., Ma, H., Zhang, J., Ozer, Z., Dovat, S., Mao, C., Ishkhanian, R., Goodman, P., and Qazi, S. (2012). Serine phosphorylation by SYK is critical for nuclear localization and transcription factor function of Ikaros. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18072-18077.

Uckun, F.M., Qazi, S., Cely, I., Sahin, K., Shahidzadeh, A., Ozercan, I., Yin, Q., Gaynon, P., Termuhlen, A., Cheng, J., *et al.* (2013). Nanoscale liposomal formulation of a SYK P-site inhibitor against B-precursor leukemia. *Blood* *121*, 4348-4354.

Udyavar, A.R., Hoeksema, M.D., Clark, J.E., Zou, Y., Tang, Z., Li, Z., Li, M., Chen, H., Statnikov, A., Shyr, Y., *et al.* (2013). Co-expression network analysis identifies Spleen Tyrosine Kinase (SYK) as a candidate oncogenic driver in a subset of small-cell lung cancer. *BMC Syst Biol* *7 Suppl 5*, S1.

Urzainqui, A., Serrador, J.M., Viedma, F., Yáñez-Mó, M., Rodríguez, A., Corbí, A.L., Alonso-Lebrero, J.L., Luque, A., Deckert, M., Vázquez, J., *et al.* (2002). ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity* *17*, 401-412.

Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J* *31*, 2714-2736.

van Noort, M., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2002). Identification of two novel regulated serines in the N terminus of beta-catenin. *Exp Cell Res* *276*, 264-272.

van Veelen, W., Le, N.H., Helvensteijn, W., Blonden, L., Theeuwes, M., Bakker, E.R., Franken, P.F., van Gorp, L., Meijlink, F., van der Valk, M.A., *et al.* (2011). β -catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* *60*, 1204-1212.

Veillette, A., Latour, S., and Davidson, D. (2002). Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annu Rev Immunol* *20*, 669-707.

Wakahashi, S., Sudo, T., Oka, N., Ueno, S., Yamaguchi, S., Fujiwara, K., Ohbayashi, C., and Nishimura, R. (2013). VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug: a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer. *Transl Res* *162*, 181-190.

Wang, L., Duke, L., Zhang, P.S., Arlinghaus, R.B., Symmans, W.F., Sahin, A., Mendez, R., and Dai, J.L. (2003). Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Res* *63*, 4724-4730.

Wang, L., Shalek, A.K., Lawrence, M., Ding, R., Gaublomme, J.T., Pochet, N., Stojanov, P., Sougnez, C., Shukla, S.A., Stevenson, K.E., *et al.* (2014). Somatic mutation as a mechanism of Wnt/ β -catenin pathway activation in CLL. *Blood* *124*, 1089-1098.

Wang, S., Ding, Y.B., Chen, G.Y., Xia, J.G., and Wu, Z.Y. (2004). Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* *10*, 1815-1818.

Wang, W., Smits, R., Hao, H., and He, C. (2019). Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Cancers. *Cancers (Basel)* *11*.

Wang, X., Mychajlowycz, M., Lau, C., Gutierrez, C., Scott, J.A., and Chow, C.W. (2012). Spleen tyrosine kinase mediates BEAS-2B cell migration and proliferation and human rhinovirus-induced expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8. *J Pharmacol Exp Ther* *340*, 277-285.

Wang, Y.H., Fan, L., Wang, L., Zhang, R., Zou, Z.J., Fang, C., Zhang, L.N., Li, J.Y., and Xu, W. (2013). Expression levels of Lyn, Syk, PLC γ 2 and ERK in patients with chronic lymphocytic leukemia, and higher levels of Lyn are associated with a shorter treatment-free survival. *Leuk Lymphoma* *54*, 1165-1170.

Wang, Z., and Ma, Q. (2007). Beta-catenin is a promising key factor in the SDF-1/CXCR4 axis on metastasis of pancreatic cancer. *Med Hypotheses* *69*, 816-820.

Weng, J., Yu, L., Chen, Z., Su, H., Yu, S., Zhang, Y., Lei, X., Chen, L., Cui, Y., Huang, Q., *et al.* (2019). β -Catenin phosphorylation at Y654 and Y142 is crucial for high mobility group box-1 protein-induced pulmonary vascular hyperpermeability. *J Mol Cell Cardiol* *127*, 174-184.

Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., and Pals, S.T. (1999). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* *154*, 515-523.

Willert, J., Epping, M., Pollack, J.R., Brown, P.O., and Nusse, R. (2002). A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol* *2*, 8.

Winston, J.T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C.Y., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1999). The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in β -catenin and stimulates β -catenin ubiquitination in vitro. *Genes Dev* *13*, 270-283.

Wolf, D., Rodova, M., Miska, E.A., Calvet, J.P., and Kouzarides, T. (2002). Acetylation of β -catenin by CREB-binding protein (CBP). *J Biol Chem* *277*, 25562-25567.

Woodside, D.G., Obergefell, A., Leng, L., Wilsbacher, J.L., Miranti, C.K., Brugge, J.S., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (2001). Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin β cytoplasmic domains. *Curr Biol* *11*, 1799-1804.

Woodside, D.G., Obergefell, A., Talapatra, A., Calderwood, D.A., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (2002). The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin β cytoplasmic domains. *J Biol Chem* *277*, 39401-39408.

Wu, G., and He, X. (2006). Threonine 41 in β -catenin serves as a key phosphorylation relay residue in β -catenin degradation. *Biochemistry* *45*, 5319-5323.

Wu, G., Xu, G., Schulman, B.A., Jeffrey, P.D., Harper, J.W., and Pavletich, N.P. (2003). Structure of a β -TrCP1-Skp1- β -catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(β -TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* *11*, 1445-1456.

Wu, H., Symes, K., Seldin, D.C., and Dominguez, I. (2009). Threonine 393 of β -catenin regulates interaction with Axin. *J Cell Biochem* *108*, 52-63.

Wu, X., Tu, X., Joeng, K.S., Hilton, M.J., Williams, D.A., and Long, F. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of β -catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* *133*, 340-353.

Xi, Y., Wei, Y., Sennino, B., Ulsamer, A., Kwan, I., Brumwell, A.N., Tan, K., Aghi, M.K., McDonald, D.M., Jablons, D.M., *et al.* (2013). Identification of pY654- β -catenin as a critical co-factor in hypoxia-inducible factor-1 α signaling and tumor responses to hypoxia. *Oncogene* *32*, 5048-5057.

Xing, Y., Takemaru, K., Liu, J., Berndt, J.D., Zheng, J.J., Moon, R.T., and Xu, W. (2008). Crystal structure of a full-length β -catenin. *Structure* *16*, 478-487.

Yan, C., Liu, C., Jin, Q., Li, Z., Tao, B., and Cai, Z. (2012). The promoter methylation of the Syk gene in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Oncol Lett* *4*, 505-508.

Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., and Yamamura, H. (2001). Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun* *288*, 495-498.

Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* *117*, 927-939.

Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K., and Lu, Z. (2011). Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* *480*, 118-122.

Yang, Z., Huo, L., Chen, H., Ni, B., Xiang, J., Kang, L., Wang, L., Peng, J., Yuan, Y., and Wang, J. (2013). Hypermethylation and prognostic implication of Syk gene in human colorectal cancer. *Med Oncol* *30*, 586.

Yankee, T.M., Keshvara, L.M., Sawadikosol, S., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1999). Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-Cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain. *J Immunol* *163*, 5827-5835.

Yin, J., Wan, Y.J., Li, S.Y., Du, M.J., Zhang, C.Z., Zhou, X.L., and Cao, Y.J. (2011). The distinct role of guanine nucleotide exchange factor Vav1 in Bcl-2 transcription and apoptosis inhibition in Jurkat leukemia T cells. *Acta Pharmacol Sin* 32, 99-107.

Ying, L., Mills, J.A., French, D.L., and Gadue, P. (2015). OCT4 Coordinates with WNT Signaling to Pre-pattern Chromatin at the SOX17 Locus during Human ES Cell Differentiation into Definitive Endoderm. *Stem Cell Reports* 5, 490-498.

Yook, J.I., Li, X.Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H.S., Kim, N.H., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Choi, Y.J., Kim, J., *et al.* (2006). A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol* 8, 1398-1406.

Ysebaert, L., Chicanne, G., Demur, C., De Toni, F., Prade-Houdellier, N., Ruidavets, J.B., Mansat-De Mas, V., Rigal-Huguet, F., Laurent, G., Payrastre, B., *et al.* (2006). Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia* 20, 1211-1216.

Yu, Y., Suryo Rahmanto, Y., Shen, Y.A., Ardighieri, L., Davidson, B., Gaillard, S., Ayhan, A., Shi, X., Xuan, J., Wang, T.L., *et al.* (2019). Spleen tyrosine kinase activity regulates epidermal growth factor receptor signaling pathway in ovarian cancer. *EBioMedicine* 47, 184-194.

Yuan, Y., Mendez, R., Sahin, A., and Dai, J.L. (2001). Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer Res* 61, 5558-5561.

Yuan, Y., Wang, J., Li, J., Wang, L., Li, M., Yang, Z., Zhang, C., and Dai, J.L. (2006). Frequent epigenetic inactivation of spleen tyrosine kinase gene in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 6687-6695.

Zhang, J., Benavente, C.A., McEvoy, J., Flores-Otero, J., Ding, L., Chen, X., Ulyanov, A., Wu, G., Wilson, M., Wang, J., *et al.* (2012). A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature* 481, 329-334.

Zhang, J., Billingsley, M.L., Kincaid, R.L., and Siraganian, R.P. (2000). Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol Chem* 275, 35442-35447.

Zhang, J., Kimura, T., and Siraganian, R.P. (1998). Mutations in the activation loop tyrosines of protein tyrosine kinase Syk abrogate intracellular signaling but not kinase activity. *J Immunol* 161, 4366-4374.

Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W.T., Lee, H.T., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., Wang, Y., *et al.* (2011). FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell* 20, 427-442.

Zhang, S., Deen, S., Storr, S.J., Yao, A., and Martin, S.G. (2019). Expression of Syk and MAP4 proteins in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 145, 909-919.

Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Ehrlich, S.M., Fields, J.Z., and Boman, B.M. (2001a). Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 61, 8664-8667.

Zhang, X., Gaspard, J.P., and Chung, D.C. (2001b). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 61, 6050-6054.

Zhang, X., Shrikhande, U., Alicie, B.M., Zhou, Q., and Geahlen, R.L. (2009a). Role of the protein tyrosine kinase Syk in regulating cell-cell adhesion and motility in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7, 634-644.

Zhang, X., Wang, L., and Qu, Y. (2020). Targeting the β -catenin signaling for cancer therapy. *Pharmacol Res*, 104794.

Zhang, Y., Oh, H., Burton, R.A., Burgner, J.W., Geahlen, R.L., and Post, C.B. (2008). Tyr130 phosphorylation triggers Syk release from antigen receptor by long-distance conformational uncoupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11760-11765.

Zhang, Z., Deb, A., Pachori, A., He, W., Guo, J., Pratt, R., and Dzau, V.J. (2009b). Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. *J Mol Cell Cardiol* *46*, 370-377.

Zheng, N., and Shabek, N. (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem* *86*, 129-157.

Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* *6*, 931-940.

Zhou, F., Hu, J., Ma, H., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2006). Nucleocytoplasmic trafficking of the Syk protein tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* *26*, 3478-3491.

Zhu, G., Wang, Y., Huang, B., Liang, J., Ding, Y., Xu, A., and Wu, W. (2012). A Rac1/PAK1 cascade controls β -catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene* *31*, 1001-1012.

Zhu, X., Jin, H., Xia, Z., Wu, X., Yang, M., Zhang, H., Shang, X., Cheng, R., Zhan, Z., and Yu, Z. (2017). Vav1 expression is increased in esophageal squamous cell carcinoma and indicates poor prognosis. *Biochem Biophys Res Commun* *486*, 571-576.

Zyss, D., Montcourrier, P., Vidal, B., Anguille, C., Mérezègue, F., Sahuquet, A., Mangeat, P.H., and Coopman, P.J. (2005). The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression. *Cancer Res* *65*, 10872-10880.

Résumé :

La prolifération cellulaire incontrôlée caractérisant les pathologies tumorales implique tout particulièrement des dérégulations de voies de signalisation cellulaire. Les protéines Vav1, Syk et β -caténine comptent parmi les effecteurs importants de signalisation dont l'expression et/ou l'activité sont dérégulées dans les cellules cancéreuses. Ce travail de thèse a porté sur l'étude des liens fonctionnels entre Vav1, Syk et la β -caténine dans une lignée cellulaire de carcinome pulmonaire. Nous avons montré que dans ces cellules Syk interagit avec Vav1 mais que la kinase phosphoryle le facteur d'échange sur des résidus différents de ceux des cellules hématopoïétiques. Syk, comme Vav1, interagit avec la β -caténine ; elle module certaines de ses modifications post-traductionnelles ainsi que l'expression de certains de ses gènes cibles. Les trois protéines sont impliquées dans la régulation de la migration cellulaire via les GTPases Rac1 et Cdc42. Par ailleurs, nous montrons que le gène Syk est un nouveau gène cible de la β -caténine avec l'identification de deux sites de fixation du complexe β -caténine/TCF4 sur son promoteur. En conclusion, nos travaux identifient et caractérisent le trio Vav1, Syk et β -caténine dans des cellules épithéliales comme dans les cellules hématopoïétiques. Nos données permettront d'établir un différentiel des fonctions de ce trio entre les deux types cellulaires pour mieux appréhender leurs rôles dans la tumorigénèse.

Mots clés : Syk, Vav1, β -caténine, cancer, signalisation.

Abstract :

Cancers are usually characterized by uncontrolled growth and spreading of tumour cells. Particularly, such dysfunctions are linked to deregulation of cell signaling pathways. Vav1, Syk and β -catenin are among the important signaling effectors of which expression and / or activity are deregulated in cancer cells. This PhD project aimed at establishing the functional links between Vav1, Syk and β -catenin in a lung carcinoma cell line. We demonstrated that in these cells Syk interacts with Vav1 but the kinase phosphorylates the exchange factor at sites different from those in hematopoietic cells. Syk, like Vav1, interacts with β -catenin and both modulate several post-translational modifications of the factor as well as the expression of target genes. The three proteins are involved in the regulation of cell migration through the activation Rac1 and Cdc42 GTPases. Furthermore, we describe Syk as a new target gene for β -catenin with the identification of two binding sites for the β -catenin / TCF4 complex on Syk promoter. In conclusion, our work contributes to the identification and the characterization of the trio Vav1, Syk and β -catenin in epithelial cells as already described in hematopoietic cells. Our data allow establishing differential functions for this trio between the two cell types in order to better understand their roles in tumorigenesis.

Key words: Syk, Vav1, β -catenin, cancer, cell signaling